

**Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg - Essen**

Institut für Virologie  
Universitätsklinikum Essen

***Bestimmung von Interferon  $\gamma$  nach In-vitro und In-vivo  
Stimulation von peripheren Blutlymphozyten im Woodchuck mit  
rekombinantem humanem Interleukin 12***

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg – Essen

*Vorgelegt von  
Christine Stolk, geb. Pohl  
aus Haselünne*

*2008*

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Forsting  
1.Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Roggendorf  
2.Gutachterin: Frau Priv.-Doz. Dr. med. E. Cario

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Oktober 2008

# **Inhaltsverzeichnis**

1 Einleitung.....	5
1.1 Einführung.....	5
1.2 Die Hepadnaviren.....	5
1.3 Das Hepatitis-B-Virus.....	6
1.3.1 Aufbau und Replikation des Virus.....	6
1.3.2 Epidemiologie.....	7
1.3.3 Infektionsverlauf und Klinik der akuten Hepatitis B.....	8
1.3.4 Infektionsverlauf und Klinik der chronischen Hepatitis B.....	10
1.3.5 Therapie der chronischen HBV-Infektion.....	12
1.4 Das Woodchuck-Hepatitis-Virus.....	15
1.5 Zytokine und ihre Bedeutung für die HBV-Replikation.....	17
1.5.1 Interleukin 12.....	17
1.5.2 Interferon $\gamma$ .....	18
1.6 Ziele.....	19
2 Material und Methoden.....	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Zellen.....	21
2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.3 Geräte.....	22
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Gewebekultur.....	23
2.2.2 Isolierung und Stimulierung peripherer Blutlymphozyten.....	24
2.2.3 Bioassay.....	25
2.2.4 Enzymimmunoassay (ELISA).....	27
2.2.5 Spot-Blot-Hybridisierung .....	28
2.2.6 WHV Polymerase Ketten Reaktion (WHV-PCR).....	29

2.2.7 SDH-Testung (Sorbitol-Dehydrogenase).....	30
2.2.8 Vorgehensweise.....	31
2.2.8.1 In-vitro-Vorversuche zur Dosisfindung von IL-12.....	31
2.2.8.2 In-vitro-Versuche zum Vergleich der IFN-Produktion der peripheren Blutlymphozyten naiver und chronisch WHV-infizierter Woodchucks nach Stimulation mit IL-12.....	31
2.2.8.3 In-vivo-Therapie chronisch WHV-infizierter Woodchucks mit IL-12.....	32
2.2.8.4 Versuch der akuten Infektion.....	32
3 Ergebnisse.....	34
3.1 Bestimmung der optimalen IL-12-Dosis in vitro.....	34
3.2 IFN-Produktion der peripheren Blutlymphozyten naiver Woodchucks nach In-vitro- Stimulation mit 50 U/ml rhIL-12.....	38
3.3 IFN-Produktion der peripheren Blutlymphozyten chronisch WHV-infizierter Woodchucks nach In-vitro-Stimulation mit 50 U/ml rhIL-12.....	43
3.4 In-vivo-Stimulation chronisch WHV-infizierter Woodchucks mit rhIL-12.....	47
3.5 IFN- $\gamma$ -Produktion während akuter WHV-Infektion.....	50
4 Diskussion.....	55
5 Zusammenfassung.....	61
6 Literaturverzeichnis.....	62
7 Abkürzungsverzeichnis.....	69
8 Abbildungsverzeichnis.....	71
9 Danksagung.....	73
10 Lebenslauf.....	74

# **1 Einleitung**

## **1.1 Einführung**

Die Hepatitis-B-Virusinfektion (HBV-Infektion) ist weltweit eine der häufigsten Infektionserkrankungen. Durch chronische Verläufe und Ausbildung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) führt sie in vielen Fällen zum Tod des Patienten. Die bisherigen Therapieansätze zeigen noch keinen ausreichenden Erfolg.

In den Versuchen dieser Arbeit soll im Woodchuck, einem etablierten Tiermodell der HBV-Infektion, die Rolle von Interleukin 12 (IL-12) und Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) auf den Verlauf der Virämie während der akuten und der chronischen Infektion charakterisiert werden.

## **1.2 Die Hepadnaviren**

Die Vertreter der Familie der Hepadnaviridae sind gekennzeichnet durch eine zirkuläre, partiell doppelsträngige DNA. Neben dem humanpathogenen HBV, welches einen Durchmesser von 42 nm hat, sind weitere pathogene Viren der Hepadna-Gruppe bei verschiedenen Tiergruppen identifiziert worden. Es wurde zuerst das Woodchuck-Hepatitis-Virus (WHV) entdeckt [Summers, J. et al., 1978]. Es folgte die Identifizierung weiterer Viren aus der Familie der Hepadnaviridae bei anderen Tierspezies wie dem Erdhörnchen (ground squirrel hepatitis virus, GSHV), dem Waldhörnchen (tree squirrel hepatitis virus), der Pekingerente (duck HBV, DHBV) und weiteren weniger gut charakterisierten Viren. Diese Viren haben alle eine sehr ähnliche Struktur, zeigen eine hohe Antigenverwandtschaft und haben den gleichen, speziellen Mechanismus der DNA-Replikation über ein RNA-Intermediat. Neben dem Hepatotropismus ist außerdem die hohe Wirtsspezifität den Hepadnaviridae gemeinsam. Eine Infektion mit diesen Viren ist meist assoziiert mit einer Hepatitis, welche akut selbstlimitierend oder chronisch verlaufen

kann. Spätfolgen einer durch diese Viren ausgelösten Hepatitis können Leberzirrhose und das hepatozelluläre Karzinom (HCC) sein [Blaine Hollinger, F. und Liang, T., 2001], [Gerlich, WH. und Schaefer, S., 2002], [Robinson, GL. 1995].

## **1.3 Das Hepatitis-B-Virus**

### **1.3.1 Aufbau und Replikation des Virus**

Das HBV ist ein DNA-Virus, dessen äußere Hülle von Hepatitis-B-Oberflächenantigenen (HBsAg) gebildet wird. Diese viruskodierten Proteine werden bei der Replikation des HBV in Leberzellen im Überschuss produziert und in das Blut freigesetzt. Im Serum infizierter Personen ist HBs-Antigen als nicht infektiöses, sphärisches oder tubuläres Partikel mit einem Durchmesser von ca. 22 nm nachweisbar.

Die Virushülle wird aus drei koterminalen HBs-Proteinen gebildet, die als L-(large), M-(middle) oder S-(small) HBs-Protein bezeichnet werden [Gerlich, WH. und Schaefer, S., 2002]. Die Entfernung des HBsAg durch Detergentienbehandlung von Dane-Partikeln bringt ein 27nm-messendes Kernpartikel zum Vorschein. Das HBeAg stellt eine sezernierte Form dieses HBcAg dar. Im Inneren des Kerns lassen sich außerdem die zirkuläre, partiell doppelsträngige DNA, eine HBV-spezifische DNA-Polymerase und eine HBV-assoziierte Phosphokinase nachweisen.

HBV und alle anderen Hepadnaviren erreichen über den Blutweg die Leber und vermehren sich in Hepatozyten. Die Rezeptoren, die die Einschleusung von HBV in die Hepatozyten vermitteln, sind bisher nicht bekannt. Die HBs-Hülle wird wahrscheinlich bei Durchtritt des HBV durch die endoplasmatische Membran abgestreift. Der nackte Core-Partikel gelangt dann an die Membranen des Zellkerns, wo das Genom in das Nukleoplasma entlassen wird. Bei der Replikation weisen die Hepadnaviren eine Besonderheit auf, die sie mit den Retroviren (wie z.B. HIV) gemeinsam haben. Beide Virusfamilien replizieren ihr Genom über ein RNA-Intermediat mittels viruskodierter

reverser Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Die virale DNA wird im Zellkern in virale mRNAs transkribiert. Vorher wurde die zunächst nur durch Basenpaare in zirkulärer Form gehaltene virale DNA kovalent geschlossen. Hierzu müssen der als Primer für die Minusstrangsynthese dienende Teil der Polymerase und der RNA-Primer entfernt, der virale Plusstrang zur vollständigen Länge synthetisiert und die Enden der komplettierten viralen Plus- und Minusstränge legiert werden. Diese DNA wird ccc-DNA genannt (covalently closed circular DNA) und ist die nukleäre Matrize für die Transkription der viralen mRNA. Eine der mRNAs dient als Matrize bzw. Intermediat für das virale Core-Protein und die virale reverse Transkriptase und ist zugleich auch RNA-Prägenom für die Replikation des Virusgenoms. Der Core-Partikel wird durch die HBs-Proteine am Endoplasmatischen Retikulum (ER) umhüllt und sezerniert. Daneben werden die drei HBs-Proteine im Überschuss produziert und als leere Hüllen sezerniert [Blaine Hollinger, F. und Liang, T., 2001], [Gerlich, WH. und Schaefer, S. 2002].

### 1.3.2 Epidemiologie

Das HBV wurde 1966 entdeckt und ist weltweit die häufigste Ursache von chronischen Virushepatitiden, Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom. Das weltweit verbreitete Virus kommt in verschiedenen Regionen mit stark unterschiedlicher Prävalenz vor. Es gibt zahlreiche asymptomatische Virusträger mit persistierender Virämie. In Afrika, Südostasien und China sind bis zu 15% der Bevölkerung asymptomatische Träger. Die Anzahl der Virusträger wird weltweit insgesamt auf 300 - 400 Mio. geschätzt, davon ca. 500.000 in Deutschland. Die Zahl der jährlichen Neuinfektionen wird auf ca. 20 Millionen geschätzt und davon ca. 100.000 in Westeuropa. Es versterben weltweit ca. 1 - 2 Mio. Personen pro Jahr an den Folgen HBV-bedingter Lebererkrankungen [Lee, WM., 1997]. In Deutschland werden pro Jahr ca. 6.000 Fälle akuter HBV-Infektionen gemeldet, die Dunkelziffer liegt vermutlich bei mehr als 50.000. Die Inzidenz der akuten HBV-Infektion im Jahr 2005 in Deutschland betrug im Durchschnitt 1,5 pro 100.000 Einwohner [Robert

*Koch Institut, 2006*]. Die Durchseuchung beträgt in hochendemischen Gebieten (wie z.B. Asien) bis 90%, in Deutschland rund 5%, hier mit dem Alter zunehmend.

Die weite Verbreitung der HBV-Infektion und ihre Häufigkeit sind bedingt durch die hohe Virus-Konzentration im Blut der Patienten (bis  $> 10^8$  Partikel/ml). HBV konnte auch in Sperma, Speichel, Vaginalflüssigkeit und Tränen von infizierten Personen nachgewiesen werden, allerdings in geringerer Konzentration. Die Übertragung des HBV erfolgt parenteral, durch i.v.-Inokulation, durch perkutane Übertragung wie z.B. Nadelstichverletzungen, perinatal oder über Schleimhautkontakt (z.B. sexuell). Das Risiko für die Übertragung der Virusinfektion hängt vom Grad der Virämie ab. Die Übertragung durch sexuellen Kontakt zu infizierten Personen ist zur Zeit der bedeutendste Risikofaktor für die normale Bevölkerung. Besondere Risikogruppen sind Drogenabhängige, Personen mit häufig wechselnden Sexualpartnern, aber auch nicht geimpftes Personal in medizinischen Bereichen, Hämophilie- und Dialysepatienten. Weitere Übertragungswege stellen Tätowierungen, Piercing und Akupunktur dar, wenn keine genügenden hygienischen Maßnahmen eingehalten werden [*Blaine Hollinger, F. und Liang, T., 2001*], [*Gerlich, WH. und Schaefer, S. 2002*].

### **1.3.3 Infektionsverlauf und Klinik der akuten Hepatitis B**

Die Abbildung 1 zeigt den typischen Verlauf des Auftretens und der Persistenz von HBV-assoziierten Antigenen und Antikörpern bei einer unkomplizierten akuten HBV-Infektion. HBsAg ist häufig schon einige Wochen vor Krankheitsbeginn im Serum nachweisbar. Auch HBeAg wird schon vor Ausbruch der Erkrankung im Serum infizierter Personen gefunden. HBsAg und HBeAg erreichen kurz vor oder bei Beginn der klinischen Symptomatik höchste Konzentrationen und bei unkompliziertem Verlauf sinkt zunächst HBeAg und dann HBsAg in einigen Wochen unter die Nachweisgrenze. Anti-HBe wird relativ früh im Verlauf der Infektion vom Körper gebildet, ist aber meist erst wenige Wochen nach dem Verschwinden des HBeAg nachzuweisen. Dieser Wert bleibt dann



über einige Jahre positiv. Anti-HBc und besonders Anti-HBc der IgM-Klasse sind schon in der Frühphase der Erkrankung in hohen Titern vorhanden. Anti-HBc-IgM sinkt in sechs bis 24 Monaten auf niedrige oder nicht mehr nachweisbare Titer ab, während Anti-HBc-IgG lebenslang positiv bleibt. Auch virusneutralisierendes Anti-HBs ist manchmal erst einige Monate nach der Erkrankung im Serum nachzuweisen, es wird aber meist schon wesentlich früher vom Körper produziert und liegt dann mit HBsAg als Komplex im Serum vor. Anti-HBs im Serum zeigt die Überwindung der Infektion und die Entwicklung von wahrscheinlich lebenslanger Immunität an. Anti-HBs bleibt bei 80% der Patienten lebenslang nachweisbar [Gerlich, WH. und Schaefer, S., 2002], [Blaine Hollinger, F. und Liang, T., 2001].

Die Inkubationszeit umfasst ungefähr 45 bis 120 Tage. Nach dem Stadium der Inkubation folgt das Prodromalstadium, welches bei Kindern häufig gekennzeichnet ist durch Erbrechen und Leibschmerzen und bei Erwachsenen durch Glieder- und Muskelschmerzen. Des Weiteren treten gastrointestinale Symptome und eine Abneigung gegen Essen und Rauchen auf. Gleichzeitig auftretende flüchtige Exantheme, eine Polyarthrititis und die sehr seltene Glomerulonephritis sind als Zeichen einer systemischen Immunreaktion zu werten. Dieses Stadium dauert meist einige Tage oder etwas länger als eine Woche.

In zwei Dritteln der Fälle verläuft die akute Erkrankung subklinisch und ohne Ikterus. Die übrigen Patienten klagen in der ikterischen Krankheitsphase, welche innerhalb der ersten 10 Tage nach dem Auftreten von Symptomen beginnt, über Hautjucken und bemerken eine Gelbfärbung der Haut sowie eine Dunkelfärbung des Urins und eine Entfärbung des Stuhls. Es kann in dieser Phase auch zu hohem Fieber, Gelenkbeschwerden und anderen extrahepatischen Begleiterkrankungen kommen wie z.B. Urtikaria, Vaskulitiden, Myopathien, Begleitpankreatitiden, Aszites, Pleuraergüssen und Spider nävi.

Die klinisch manifeste akute HBV-Infektion weist hohe Serumtransaminasen und eine vergrößerte Leber auf. In der folgenden Rekonvaleszenzphase kann die Leistungsfähigkeit trotz Normalisierung der Transaminasen noch über einen längeren Zeitraum eingeschränkt sein [Wedemeyer, H.H. und Manns, M.P. 1998].

Kommt es innerhalb der ersten 8 Wochen der Erkrankung zu einer ausgedehnten Nekrose des Lebergewebes, liegt eine fulminante Hepatitis vor (ca. 1% der Patienten). Diese ist charakterisiert durch hohes Fieber, Oberbauchbeschwerden, Erbrechen und Ikterus. Dieser Verlauf kann zu einer hepatischen Enzephalopathie führen, welche mit Koma und Krampfanfällen assoziiert ist. Früher führte die fulminante Hepatitis unbehandelt bei 70 - 90% dieser Patienten durch Aszites, Diathese, renale Dysfunktion und zerebrale Probleme zum Tod. Heutzutage wird als ultima ratio eine Lebertransplantation durchgeführt [Robinson, GL. 1995], [Wedemeyer, H.H. und Manns, M.P. 1998].

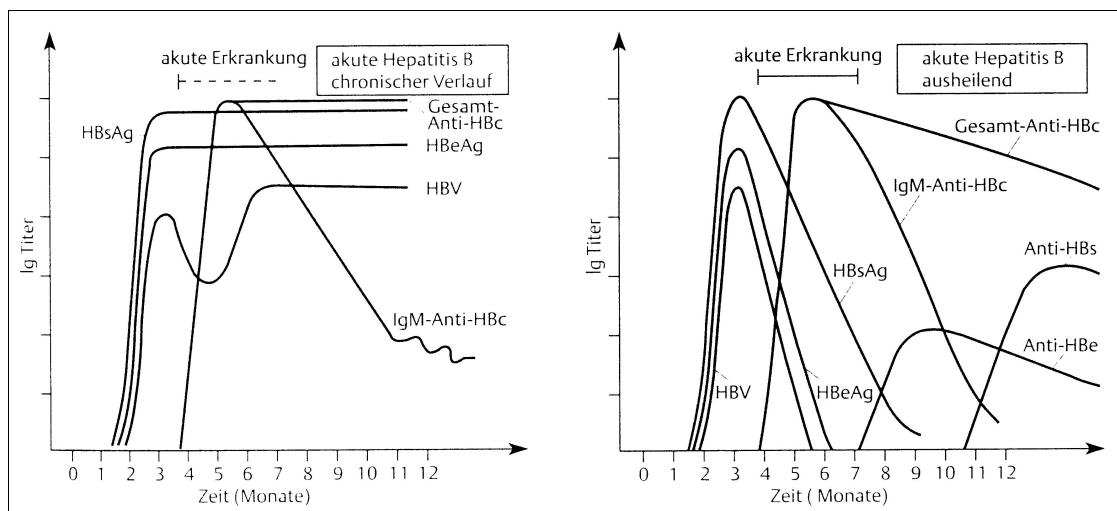


Abbildung 1: Verläufe verschiedener HBV-Infektionsformen [Gerlich, WH. und Schaefer, S., 2002]

### 1.3.4 Infektionsverlauf und Klinik der chronischen Hepatitis B

Von chronischer HBV-Infektion spricht man definitionsgemäß, wenn HBsAg über 6 Monate persistiert. Rund 5% der akuten HBV-Infektionen nehmen einen chronischen

Verlauf, wenn die Infektion im Erwachsenenalter auftritt. Bei Patienten über 60 Jahren wird die Chronizitätsrate mit ca. 10% angegeben. Kommt es dagegen zu einer Infektion in der Perinatalperiode, so steigt die Chronizitätsrate auf ca. 90%. Die Persistenz des HBsAg über einen Zeitraum von mehr als 10 Wochen gilt als prognostisch ungünstiges Zeichen. Darüber hinaus kann die Antikörperbestimmung von Anti-HBc-IgM als Aktivitätsparameter zur Beurteilung einer chronischen Lebererkrankung dienen [Robinson, GL. 1995].

Der klinische Verlauf der chronischen HBV-Infektion kann sehr unterschiedlich sein und variiert von jahrelanger Beschwerdefreiheit chronischer HBV-Träger bis zu einer schnellen Progression zur Zirrhose mit Tod des Patienten. Diejenigen chronisch infizierten Patienten, bei denen es keine klinischen oder biochemischen Belege für eine Lebererkrankung gibt, werden HBsAg-Träger genannt. Dabei unterscheidet man zwischen dem hochvirämischen („immuntolerantem“) HBsAg-Trägerstatus ( $>10^5$  Kopien/ml, entspricht  $2 \times 10^3$  IU/ml) und dem niedrigvirämischen („inaktivem“) HBsAg-Trägerstatus [Cornberg, M. et al. 2007].

Im Gegensatz dazu können bei Patienten mit chronischer HBV-Infektion, welche klinische Hinweise auf eine Lebererkrankung wie anhaltend erhöhte Transaminasen haben, anhand der Leberhistologie zwei Verlaufsformen unterschieden werden. Die Leberhistologie bei chronisch persistierender Hepatitis ist lichtmikroskopisch durch eine chronisch entzündliche Infiltration der Portalfelder bei erhaltender Läppchenarchitektur und geringer oder fehlender Fibrose gekennzeichnet. In der Mehrzahl der Fälle ist der Allgemeinzustand dieser Patienten kaum beeinträchtigt. Die Prognose ist meist günstig, es sei denn, akute entzündliche Schübe würden durch Änderung der Abwehrlage zum Bild der chronisch aktiven Hepatitis führen [Schmid, M. 1986].

Kennzeichnend für die chronisch aktive Hepatitis B ist das histologische Bild der portalen Entzündung, bestehend aus lymphozytären Infiltraten. Sie greift auf das benachbarte Leberparenchym über, und es entstehen „peace-meal-Nekrosen“ („Mottenfraß“), die das

Läppchen atrophieren und in schweren Fällen über Brückennekrosen zur Zerstörung der Läppchen führen können.

Die chronisch aktive Hepatitis B geht häufig in eine Leberzirrhose über. Dies geschieht meist allmählich über Jahre hinweg. Remissionen, d.h. ein Stillstand der Krankheit, können in jedem Stadium der Erkrankung eintreten, aber auch spontane Reaktivierungen kommen vor [Schmid, M. 1986]. Die hepatische Zirrhose unterscheidet sich im Endstadium weder klinisch noch pathologisch-anatomisch eindeutig von Zirrhosen anderer Ätiologie.

In Abhängigkeit vom Verlauf der entzündlichen Aktivität der Leber steht am Ende der chronischen Virusinfektion die Ausbildung einer Leberzirrhose, auf deren Boden sich dann ein primäres Leberzellkarzinom entwickeln kann. 25 - 40% der chronisch HBV-infizierten Patienten entwickeln im Laufe ihres Lebens eine Leberzirrhose und/oder ein hepatozelluläres Karzinom (HCC). Das Risiko an einem hepatozellulären Karzinom zu erkranken, ist bei diesen Personen im Vergleich zu nicht HBV-infizierten Personen um den Faktor 100 erhöht [Wedemeyer, H.H. und Manns, M.P. 1998], [Yim, HJ und Lok, AS., 2006].

### **1.3.5 Therapie der chronischen HBV-Infektion**

Zur Zeit sind zur Therapie der chronischen HBV-Infektion das Zytokin Interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) sowie die pegylierte Form (Peg-) IFN- $\alpha$  und mehrere Nukleosid-/ Nukleotidanaloga zugelassen.

IFN- $\alpha$  wirkt sowohl direkt antiviral auf die Replikation des HBV, wahrscheinlich indem es den Einbau des RNA-Prägenoms in die Core-Partikel hemmt, so dass es zu einem Abfall der HBV-Partikelzahl im Serum kommt. Zusätzlich wirkt es aber auch immunmodulatorisch über Steigerung der zellulären Immunantwort gegen infizierte Hepatozyten (über T-Helfer- und NK-Zellen). Peg-IFN- $\alpha$  ist mit Polyethylenglycol konjugiertes IFN, welches durch verminderte Elimination über die Niere eine verlängerte Halbwertszeit gegenüber Standard-IFN hat. Ansonsten ist das Wirkungs- und

Nebenwirkungsspektrum von Peg-IFN und Standard-IFN fast identisch. Als Nebenwirkungen treten grippeähnliche Beschwerden, Schädigung der Blutbildung und Induktion von Autoimmunphänomenen auf. Standard in der Verabreichung von IFN- $\alpha$  ist die Injektion von dreimal 5 - 10 Megaeinheiten wöchentlich für 4 - 6 Monate. Peg-IFN- $\alpha$  muss aufgrund der längeren Halbwertszeit nur einmal wöchentlich injiziert werden. Mit dieser Dosierung erreicht man gute Effekte und ausreichende Toleranz [Cornberg, M. et al. (2007)], [Osborn, M. und Lok, A., 2006]. In einer Studie über einen Therapiezeitraum von 24 Wochen zeigte die Therapie mit Peg-IFN allerdings einen besseren therapeutischen Effekt mit Reduktion der HBV-DNA-Level bei 19 - 28% der Patienten im Gegensatz zu einer Reduktion bei 12% der Patienten, welche mit Standard-IFN therapiert wurden [Marcellin, P. et al., 2005].

Eine komplette Ausheilung (HBsAg-negativ) unter Interferontherapie wird selten beobachtet, so dass die Serokonversion von HBeAg nach Anti-HBe als Ausdruck einer reduzierten HBV-Replikation als Therapieziel definiert wird. Damit verbunden ist die Reduktion der Mortalität und Morbidität, unabhängig von der Elimination des HBsAg. Die definitive Ausheilung mit Elimination von HBsAg kann sich über Jahre hinziehen. Gemäß einer Metaanalyse an 15 kontrollierten Studien erfolgte eine Serokonversion bei 33% der Behandelten verglichen mit 12% der Kontrollgruppen, so dass etwa 20 - 25% der Patienten von einer Therapie profitieren. Günstige Parameter für eine erfolgreiche Therapie sind eine hohe entzündliche Aktivität (hohe Transaminasen), niedrige HBV-DNA-Level im Serum und HBeAg-Positivität [Niederau, C. et al., 1996]. In bestimmten Fällen ist eine Interferontherapie nicht indiziert, unter anderem bei immunsupprimierten Patienten wegen einer schlechten Ansprechrate, bei Patienten nach einer Organtransplantation unter Immunsuppression wegen gehäuft beobachteter Abstoßungsreaktionen und bei Patienten mit HBV-bedingter Leberzirrhose wegen der Gefahr der Dekompensation der Rest-Leberfunktion [Rote Liste 2005].

Ein schon seit längerem in Deutschland zugelassenes Nukleosidanalogon ist Lamivudin. Es hemmt die HBV-Polymerase [Dienstag, J.L. et al., 1995]. Lamivudin wird nach oraler

Gabe gut resorbiert und hemmt dosisabhängig die Replikation des HBV [Leung, N., 2000]. Bei 93 - 100% der behandelten Patienten sinkt die HBV-DNA unter der Therapie auf ein nicht nachweisbares Niveau ab und bei mehr als der Hälfte der Patienten kann histologisch eine Verbesserung der Hepatitis festgestellt werden [Dienstag, J.L. et al., 1999], [Lai, C.L. et al., 1998]. Das Virustatikum ist gut verträglich. Da die Lamivudin-Therapie nicht zur vollständigen Elimination des Virus führt und bei fast allen Patienten nach Absetzen der Therapie wieder HBV-DNA nachweisbar ist, ist eine lebenslange Therapie theoretisch angezeigt [Lok, A. et al., 2001]. Ein Problem der Langzeittherapie ist die Resistenzentwicklung, zu der es bei ca. 24% der Patienten im ersten Therapiejahr kommt und im Verlauf zunimmt auf ca. 38% im zweiten Jahr und ca. 50% im dritten und 67% im vierten Jahr [Marcellin, P. et al., 2005]. Verantwortlich dafür sind Mutationen im Bereich des HBV-Polymerase-Gens. Bei Auftreten von Resistenzen kann Adefovir, ein Nukleotidanalogen mit ähnlicher Wirksamkeit wie Lamivudin aber deutlich geringerer Tendenz zur Resistenzentwicklung eingesetzt werden. Eine Therapie über 48 Wochen zeigte einen signifikanten Abfall der HBV-Viruslast, eine deutliche Erhöhung der HBeAg-Konversionsrate und eine Besserung der histologischen Entzündungsaktivität. Als beste Dosierung stellte sich die orale Gabe von 10 mg pro Tag heraus. Nach Absetzen der Therapie wurden Reaktivierungen der Infektion beobachtet, so dass auch hier eine dauerhafte Therapie angezeigt ist [Malik, A.H. et al., 2000], [Marcellin, P. et al., 2005].

Vor kurzem wurden weitere Nukleosidanaloga zur Therapie der HBV-Infektion zugelassen: z.B. Entecavir. Klinische Untersuchungen zeigten, dass es die HBV-Replikation wirksamer hemmt als Lamivudin und sich weitaus weniger Resistenzen entwickeln. Bei Patienten ohne vorherige Nukleosidtherapie wurde nach zwei Jahren Therapie mit Entecavir keine Resistenz nachgewiesen, nur bei einigen Patienten mit vorbestehender Lamivudin-resistenter HBV-Infektion kam es nach einjähriger Therapie dazu [Colonna, R.J. et al., 2004].

Es wurden bereits einige Studien zu Kombinationstherapien durchgeführt, aber die Ergebnisse waren mit denen der Monotherapie zu vergleichen und zeigten keine Vorteile [Marcellin, P. et al, 2004], [Lau, GK. et al, 2005].

Die Therapie des HCC als Folge einer chronischen HBV-Infektion ist bisher ebenfalls unbefriedigend. Eine chirurgische Resektion der entsprechenden Lebersegmente ist bei meist vorgeschädigter Leber oft nicht ohne Probleme möglich. Nach Lebertransplantation kommt es häufig zu einer Rekurrenz des HCC im Transplantat. Unbehandelt beträgt die mittlere Überlebensdauer nach Diagnose unter einem Jahr [Suarez, Y. et al., 2000].

Alle möglichen Therapieoptionen können HBV nicht vollständig eliminieren, daher ist meist eine dauerhafte Therapie angezeigt. Selbst bei einer erfolgreichen Therapie kann es zu Rückfällen kommen, so dass eine lebenslange Kontrolle der Erkrankung nötig ist. Zusammenfassend gibt es bisher noch keine kurative Therapie der chronischen HBV-Infektion und der Spätfolgen, so dass neue Therapieoptionen notwendig sind.

## **1.4 Das Woodchuck-Hepatitis-Virus**

Das amerikanische Waldmurmeltier (Woodchuck, *Marmota monax*), mit seinem für diese Tierart spezifischen Woodchuck-Hepatitis-Virus (WHV), stellt ein wichtiges Modell zur weiteren Erforschung des HBV dar.

Das WHV ist auch ein Vertreter der Familie der Hepadnaviridae und wurde im Jahre 1978 entdeckt, als den auffällig häufig auftretenden Fällen des hepatozellulären Karzinoms (HCC) bei Woodchucks des Philadelphia Zoos auf den Grund gegangen wurde [Summers, J. et al., 1978]. Es stellte sich als geeignetes Modell zur Untersuchung der humanen HBV-Infektion heraus, da es sehr große Ähnlichkeiten in der Morphologie, den Genomprodukten, der Replikation, dem Infektionsverlauf und dem Krankheitsverlauf mit der Entwicklung eines HCC aufweist [Korba, BE. et al., 1989], [Roggendorf, M. und Tolle, TK., 1995].

Die Virionen des WHV haben einen Durchmesser von 45 nm und die Virushülle besteht wie beim HBV aus drei viruskodierten Proteinen (S-WHs, M-WHs, L-WHs) und aus Lipiden der Wirtszelle. Das Nukleokapsid enthält die partiell doppelsträngige DNA. Neben den kompletten Virionen findet man im Plasma infizierter Woodchucks, vergleichbar mit dem Plasma HBV-infizierter Menschen, auch leere, sphärische oder tubuläre Partikel, die aus den drei viralen Oberflächenantigenen und Lipiden der Wirtszelle aufgebaut sind. Das WHV-Genom ist mit einem Umfang von 3300 Nukleotiden ein wenig umfangreicher als das HBV-Genom, welches aus 3200 Nukleotiden besteht [Blaine Hollinger, F. und Liang, T., 2001]. Die Genomorganisation ist bei beiden Viren identisch [Kodama, K. et al., 1985]. Auch die Replikation des Virus verläuft bei HBV und WHV analog und ist weiter oben erläutert. Es wird angenommen, dass der Weg der WHV-Infektion auch über Blut und andere Körperflüssigkeiten abläuft. Die Prävalenz der chronischen WHV-Infektion unter amerikanischen Waldmurmeltieren ist in den verschiedenen Staaten der Ostküste Amerikas dabei allerdings sehr unterschiedlich. In einigen Staaten wie Delaware und Maryland ist das WHV endemisch und es gibt bis zu 30% chronisch infizierte Tiere, in anderen Staaten wie New York oder New England sind chronisch infizierte Tiere dagegen gar nicht zu beobachten. Auf die europäischen Waldmurmeltiere (*Marmota marmota*) ist das WHV nicht übertragbar.

Bei der experimentellen Inokulation von standardisierten Mengen an WHV zeigten im Labor gezüchtete, neugeborene Woodchucks eine gleichartige Kinetik der WHV-Infektion und eine voraussagbar hohe Chronizitätsrate von ca. 60 – 75%. Bei WHV-Inokulation von juvenilen oder erwachsenen Tieren wurden dagegen nur ca. 5% chronische WHV-Träger beobachtet [Menne, S., Cote, P.J. 2007]. Die Inkubationszeit der WHV-Infektion beträgt bei Woodchucks ca. 8 - 14 Wochen. Der erste Marker der viralen Replikation ist bei experimenteller Infektion die WHV-DNA, welche ca. 3 - 8 Wochen nach Inokulation auftritt. WHsAg und WHcAg sind ca. 4 Wochen nach Inokulation in der Leber nachweisbar und Anti-WHc nach ca. 6 Wochen [Ponzetto, A. et al., 1984].



## **1.5 Zytokine und ihre Bedeutung für die HBV-Replikation**

In der Immunpathogenese viraler Infektionen spielen Zytokine eine bedeutende Rolle in der unspezifischen Abwehr. Zu den Zytokinen gehören neben den verschiedenen Interferonen auch Interleukine, Tumornekrosefaktoren und Wachstumsfaktoren. Diese Stoffe haben ganz verschiedene antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Wirkungen. Im Rahmen der Immunantwort auf eine HBV-Infektion haben Interleukin 12 (IL-12) und Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) eine besondere Bedeutung.

### **1.5.1 Interleukin 12**

IL-12 wurde 1990 erstmals als „cytotoxic lymphocyte maturation factor“ (CLMF) beschrieben [Stern, AS. et al., 1990]. Es spielt eine wichtige Rolle für die Immunantwort bei viralen Infektionen. Die heterodimere Struktur von IL-12 hat zwei Untereinheiten von 35 kDa und 40 kDa, welche über eine Disulfidbrücke verbunden sind [Stites, DP. et al., 1997]. Hauptsächlich produziert wird es von B-Zellen und Makrophagen nach Kontakt mit Fremdanigen [Lamant, AG. et al., 1996].

IL-12 hat verschiedene immunmodulatorische Effekte. Dabei unterstützt es die Th1-Antwort über unterschiedliche Wege. Zum einen fördert es die Differenzierung naiver Th0-Zellen in Richtung Th1-Zellen, anstatt in Th2-Zellen [Scott, P., 1993], [Seder, RA. et al., 1996]. Allerdings wird die Th2-Antwort auch nicht unterdrückt [Bliss, J. et al., 1996]. Th1-Zellen produzieren IL-2 und IFN- $\gamma$  und unterstützen über die Aktivierung der Makrophagen die zelluläre Immunantwort. IL-12 dient dabei als Kostimulans neben IL-2 und TNF- $\alpha$  dazu, die maximale IFN- $\gamma$ -Produktion der Th1-Zellen zu erreichen [Locksley, RM., 1993], [Trinchieri, G. et al., 1994].

Zusätzlich kann IL-12 die unspezifische Abwehr durch erhöhte Aktivität von natürlichen Killerzellen verstärken und die spezifische Abwehr in Form einer verstärkten zytolytischen T-Lymphozytenantwort (CTL-Antwort) fördern. Dies geschieht entweder über den direkten

Effekt von IL-12 auf CD8+-Zellen oder über den indirekten Weg der erhöhten Th1-Aktivität [Mehrota, P.T. et al., 1993], [Rossol, S. et al., 1997].

Durch die genannten Eigenschaften bietet IL-12 verschiedene Möglichkeiten für den therapeutischen Einsatz bei chronischer Hepatitis B. So wurde in Versuchen im Mausmodell zusätzlich zum antiviralen Effekt ein potenter Antitumor-Effekt festgestellt, der möglicherweise neben der T-Zell-Aktivierung und erhöhtem IFN- $\gamma$  auch auf einen antiangiogenen Effekt zurückzuführen ist [Gately, M.K., 1997]. Der Antitumor-Effekt ist T-Zell-abhängig und wird besonders über die verschiedenen Effekte des IFN- $\gamma$  hervorgerufen [Fujiwara, H. et al., 1995]. Die antivirale Wirkung ist im Mausmodell an unterschiedlichen Viruserkrankungen getestet worden. Zum Beispiel wurde die HBV-Replikation nachweislich bei IL-12-Therapie unterdrückt. Auch dabei wirkt IL-12 besonders über die Induktion von IFN- $\gamma$  [Ozmen, L. et al., 1995], [Cavanaugh, V.J. et al., 1997]. Durch die Behandlung mit IL-12 verschwand zytoplasmatisches HBcAg aus der Leber und aus der Niere der behandelten transgenen Mäuse.

### **1.5.2 Interferon $\gamma$**

Interferone umfassen verschiedene, miteinander nicht verwandte Proteinklassen, welche eine wichtige Rolle bei der Abwehr viraler Infektionen spielen. Dabei hemmen die Interferone die virale Replikation in den infizierten Wirtszellen [Kakumu, S. et al., 1994]. IFN- $\gamma$  wird, wie oben schon erwähnt, hauptsächlich von Th1-Zellen, NK-Zellen und CD8+-Zellen produziert. Es aktiviert Makrophagen, NK-Zellen und T-Zellen, so dass diese ihre Effektorfunktionen ausführen können. Dazu gehören unter anderem die Produktion von weiteren immunmodulatorischen und antiviralen Zytokinen. Des Weiteren beeinflusst auch IFN- $\gamma$  die T-Zell-Differenzierung in Richtung Th1-Zellen. Außerdem induziert es die Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle. Dadurch erhöht sich die Anfälligkeit von frisch mit Virus infizierten Zellen gegenüber zytotoxischen CD8+-T-Zellen [Bertoletti, A. et al., 1991].

Im transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die IL-12 vermittelte IFN- $\gamma$ -Produktion zu einer Unterdrückung der HBV-Replikation führte [Cavanaugh, VJ. et al., 1997]. Bei den Versuchen, in denen bei den transgenen Mäusen IFN- $\gamma$  über Antikörper geblockt wurde, lagen die HBV-DNA-Level wesentlich höher als bei den Tieren, in denen IFN- $\gamma$  nicht geblockt wurde [Cavanaugh, VJ. et al., 1997], [Guidotti, LG. und Chisari, FV., 2001].

In den Versuchen dieser Arbeit wurde die IFN- $\gamma$ -Produktion nach IL-12-Stimulation in In-vitro- und In-vivo-Versuchen im Woodchuck-Modell getestet. Aufgrund des ähnlichen Verlaufs der HBV- und WHV-Infektion ist dieses Modell zur Charakterisierung der antiviralen Wirkung dieser Zytokine geeignet.

## **1.6 Ziele**

Mit den Versuchen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob humanes oder murines IL-12 über Induktion der IFN- $\gamma$ -Produktion zur Therapie der chronischen WHV-Infektion geeignet sind. In einem weiteren Ansatz soll die Rolle von IFN- $\gamma$  in der chronischen vs. der akuten WHV-Infektion charakterisiert werden. Im Einzelnen wurden folgende Ziele angestrebt:

1. Die Stimulation von peripheren Blutlymphozyten naiver und chronisch WHV-infizierter Woodchucks mit rhIL-12 oder rmlIL-12 in vitro soll die Produktion von IFN- $\gamma$  induzieren.
2. Die Therapie chronisch WHV-infizierter Woodchucks mit rhIL-12 in vivo soll über Stimulation der IFN- $\gamma$ -Produktion die Virämie reduzieren.
3. In dieser Arbeit soll außerdem die Rolle von IFN in der Ausheilung der akuten WHV-Infektion im Zusammenhang mit dem Verlauf der Virämie und der Leberzellschädigung charakterisiert werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 *Material***

#### **2.1.1 Zellen**

Woodchuck-Hepatoma-Zelllinie 12/6      Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von P. Banasch, Heidelberg, Deutschland.

#### **2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien**

24-Loch-Platte	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen, Deutschland )
AIM-V-Medium	Life Technologies (New York, USA )
Avidin	Sigma Diagnostics (Steinheim, St. Louis, USA )
EppendorfgeläÙe (unterschiedliche GröÙen)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland )
Ficoll-LöÙung	Biochrom AG (Berlin, Deutschland )
Flachboden-Mikrotiterplatte (96-well)	Becton Dickinson Labware (Meylan Cedex, Frankreich )
Fötale Kälberserum (FKS)	Cytogen (Berlin, Ober-Märten, Deutschland )
GewebekulturfäÙen	Greiner bio-one GmbH
Ketamin	Hexal (Holzkirchen, Deutschland )
Kristallviolett	Sigma Diagnostics
Leuco-Sep-Röhrchen	Greiner bio-one GmbH
Nitrozellulosemembran	Amersham (Braunschweig, Deutschland )
OPD-Tablette	Sigma Diagnostics
PBS (pH:7,2)	Apotheke      Universitätsklinikum      Essen (Deutschland )
Penicillin und Streptomycin	PAA Laboratories GmbH (Linz, Öösterreich)
Perhydrol (30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck (Darmstadt, Deutschland )

PHA	Murex (Dartford, England)
Pipettierspitzen	Eppendorf
POD-Stopplösung	Dade Behring (Marburg, Deutschland )
Polyklonaler Anti-wIFN- $\gamma$ -AK (aus Kaninchen)	B. Lohrengel / M. Lu (Essen, Deutschland )
PP-Röhrchen 15ml und 50ml	Greiner bio-one GmbH
RhIL-12	Genetics Institute Inc. (Cambridge, USA )
RmIL-12	Genetics Institute Inc.
RwIFN- $\gamma$	B. Lohrengel / M. Lu
SDH-Test-Kit	Sigma Diagnostics
Serumalbumin	Serva (Heidelberg, Deutschland )
Tetrazyklin	Boehringer (Mannheim, Deutschland )
Trypsin	Cytogen (Berlin, Ober-Märten, Deutschland )
Tryptanblau	Life Technologies (New York, USA )
Tween 20	Merck
Zellkulturmedien	Cytogen

### 2.1.3 Geräte

Brutschrank	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland )
Mehrfachpipetten	Eppendorf
Mikroskop	Zeiss (Jena, Deutschland )

## **2.2 Methoden**

Mit Hilfe der folgenden Methoden sollte überprüft werden, ob durch eine IL-12-Stimulierung die Produktion der körpereigenen, antiviralen Substanz Interferon angeregt wird. Dazu wurden In-vitro- und In-vivo-Experimente am Woodchuck-Modell durchgeführt.

### **2.2.1 Gewebekultur**

Für den Bioassay wurden Zellen der Woodchuck-Hepatoma-Zelllinie 12/6 benutzt, um woodchuckspezifisches IFN (wIFN) nachweisen zu können. Diese 12/6-Zellen wurden in Gewebekulturflaschen mit 40 ml vorbereitetem Medium im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Dem benötigten Medium, HAM's F12, wurden noch 100 Units/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und 0,01 mg/ml Tetrazyclin und zusätzlich zum Schutz vor Pilzen auch 0,25 µg/ml Amphotericin B zugefügt. Als Nährstoffquelle wurde Fötales Kälberserum (FKS) zugesetzt. Dieses Medium wurde 1 - 2 Mal pro Woche gewechselt, und die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen unter sterilen Bedingungen passagiert. Dazu wurde das Medium aus der Gewebekulturflasche abgegossen und die Zellen zweimal mit ca. 20 ml PBS gewaschen, damit keine Reste des Mediums die Trypsin-Wirkung beeinflussen konnten. Zur enzymatischen Ablösung der Zellen von dem Boden der Zellkulturflasche wurden 2 - 3 ml Trypsin zugegeben. Die Ablösung erfolgte nach ca. 5 Minuten. Um Schädigung der Zellen zu vermeiden, mussten diese sofort in ca. 80 ml neuem Medium aufgenommen werden. Diese Zellsuspension wurde dann auf zwei Kulturflaschen aufgeteilt, welche im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert wurden. Nach ca. 1 Woche lag ein konfluenten Zellrasen vor und die Zellen konnten wieder gesplittet werden.

### **2.2.2 Isolierung und Stimulierung peripherer Blutlymphozyten**

Die In-vitro-Versuche wurden mit peripheren Blutlymphozyten von Woodchucks durchgeführt. Um diesen Tieren Blut aus einer Beinvene abnehmen zu können, wurden sie mittels einer Injektionsnarkose in den Glutealmuskel narkotisiert. Üblicherweise werden dazu 1 ml Xylazin (2% Xylazinhydrochlorid) und 4 ml Ketamin (10% Ketaminhydrochlorid) verwendet.

Zur Gewinnung der peripheren Blutlymphozyten wurde das EDTA-Blut (1:2 mit PBS verdünnt) steril über 16 ml Ficoll-Lösung in ein 50-ml-Leuco-Sep-Greiner-Röhrchen geschichtet und dann ca. 10 Minuten zentrifugiert (1600 U/min). Der „Lymphozytenring“ oberhalb des Filters wurde vorsichtig abpipettiert und in ein Greiner-Röhrchen gefüllt, welches dann mit PBS auf 50 ml aufgefüllt wurde. Anschließend wurden die Röhrchen zuerst für 10 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert, der Überstand abgegossen, die Zellen resuspendiert und das Röhrchen wieder mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Dieser Waschvorgang wurde noch zwei Mal wiederholt. Die Zellen wurden dann in 10 ml AIM-V-Medium aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Zählkammer. Dazu wurden 50 µl der Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau gemischt, um alle abgestorbenen Zellen blau zu färben. Nach Ermittlung der Gesamtzellzahl wurde diese auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  pro ml eingestellt. Den Zellen wurde noch 2 µl PHA pro ml zur unspezifischen Stimulation hinzugegeben. Die eine Hälfte der Zellsuspension wurde belassen und der anderen wurden verschiedene Konzentrationen rhIL-12 oder rmIL-12 pro ml zugefügt. Beide Suspensionen wurden mit je 1 ml pro well auf eine 24-Loch-Platte verteilt. Die Platten wurden im 37°C-CO<sup>2</sup>-Brutschrank inkubiert und nach drei Stunden (= Nullwert) und an den folgenden drei Tagen wurden aus jedem well vorsichtig 3 x 100 µl der Überstände in sterile Eppendorftubes pipettiert. Diese Proben wurden sofort bei -20° eingefroren.

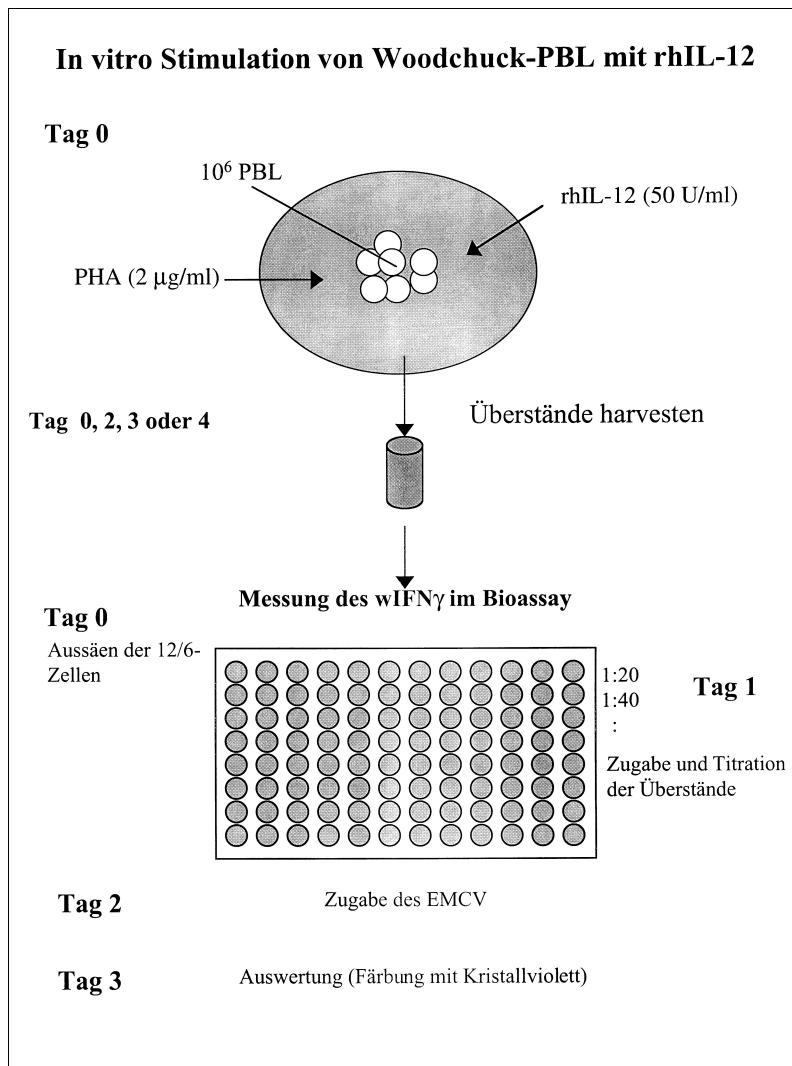
### 2.2.3 Bioassay

Der Gehalt an IFN in diesen Überständen wurde mit Hilfe eines Bioassays bestimmt. IFN- $\gamma$  und IFN- $\alpha$  schützen einige Zelllinien vor einer Infektion mit einem Virus, in diesem Fall dem Enzephalomyokarditisvirus (EMCV).

Für den Bioassay wurde eine Flachboden-Mikrotiterplatte mit 12/6-Zellen beschickt. Für eine MTP wurde eine mit 12/6-Zellen dicht besiedelte mittlere Gewebekulturflasche benötigt. Diese wurde mit PBS zwei Mal gründlich gewaschen, bevor die Zellen mit ca. 5 ml Trypsin wenige Minuten im Brutschrank inkubiert wurden. Die abgelösten Zellen wurden dann in 20 ml HAM's F12-Medium, welches mit 10% FKS angereichert war, aufgenommen und gut vermischt. In jeden Napf der MTP wurde unter sterilen Bedingungen je 200  $\mu$ l dieser Suspension gefüllt. Die MTP wurde im CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 37°C inkubiert, um einen konfluenten Zellrasen zu erhalten.

Nach 24 Stunden wurde die MTP mit rekombinantem IFN- $\gamma$  als Positivkontrolle und den Proben beschickt. Unter sterilen Bedingungen wurde das Medium vom Vortag aus den Näpfen abgegossen und je 100  $\mu$ l HAM's F 12-Medium ohne Zusätze in jeden Napf vorgelegt. Die eigentliche Beschickung mit den Proben erfolgte dann mit einer Positiv- und Negativkontrolle in Doppelansätzen. Als Negativkontrolle wurden in die ersten beiden Spalten weitere 100  $\mu$ l HAM's F12-Medium ohne Zusätze gefüllt und als Positivkontrolle wurde rekombinantes wIFN- $\gamma$  in einer Verdünnung von 1:200 (d.h. 1  $\mu$ l rwIFN- $\gamma$  auf 100  $\mu$ l Medium) verwendet.





*Abbildung 2: Versuchsaufbau der In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchucks*

Dieses rwIFN- $\gamma$  wurde von Frau Dr. Lohrengel isoliert [Lohrengel, B. et al., 1998]. Anschließend wurden die Proben und Kontrollen, die in Reihe A aufgetragen wurden, seriell in einer Titrationsreihe 1:2 verdünnt. Nach diesem Vorgehen wurde die Platte für weitere 20 Stunden im 5%-CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert.

Am dritten Tag wurde nach Entfernen des Mediums vom Vortag EMCV 1:10000 in HAM's verdünnt und in alle Näpfe, außer der der Negativkontrolle, pipettiert. In diese wurde ausschließlich 100 µl Medium ohne Zusätze gefüllt.

Nach weiteren 16 - 24 Stunden Inkubation (37°, 5% CO<sub>2</sub>) wurde die MTP am 4. Tag angefärbt und abgelesen. Angefärbt wurden die Zellen mit verdünnter Kristallviolett-Lösung. 50 µl dieser Lösung wurden mit einer Mehrfachpipette zu den schon vorhandenen 100 µl in jeden Napf pipettiert und sofort danach abgegossen und abgespült. Das EMC-Virus bewirkt einen zytopathischen Effekt. Die infizierten Zellen sterben ab und lösen sich vom Boden der MTP. Interferon schützt vor der Infektion und unter dem Mikroskop sind dann unveränderte Zellen zu sehen. Durch diese Vitalfärbung mit Kristallviolett-Lösung konnte der Gehalt an IFN über den Anteil lebender Zellen nach EMCV-Infektion gemessen werden.

#### **2.2.4 Enzymimmunoassay (ELISA)**

Einige Überstände der peripheren Blutlymphozyten, die im Bioassay einen hohen IFN-Titer gezeigt hatten, wurden in einem von Frau Dr. Lohrengel entwickelten ELISA untersucht, um zu differenzieren, ob der schützende Effekt im Bioassay durch IFN- $\alpha$  oder - $\gamma$  vermittelt war. Die MTP wurde mit einem polyklonalen AK aus Kaninchen gegen das rIFN- $\gamma$  (1:100 in Carbonatpuffer; 100 µl) gecoatet (Inkubation über Nacht bei 4°C). Am nächsten Tag wurde die Flüssigkeit abgegossen und die MTP drei Mal mit Tween 20 gewaschen (5 ml Tween (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat) auf 1 Liter PBS-Lösung). Danach wurde mit 10 - 20% Serumalbumin geblockt (1 Stunde bei 37°C). Nach erneutem dreimaligem Waschen mit Tween 20 wurden 100 µl der Proben oder der Kontrollen auf die MTP gegeben, zu je 100 µl vorgelegtem PBS pro well. Anschließend wurde titriert. In einer zwei-stündigen Inkubation bei 37° konnte sich IFN- $\gamma$ , soweit vorhanden, an den gebundenen polyklonalen Anti-IFN- $\gamma$ -AK binden, bevor sie wieder drei Mal mit Tween 20 gewaschen wurde. Danach wurde ein polyklonaler, biotinylierter AK gegen rIFN- $\gamma$  in einer 1:400 Lösung auf die MTP gegeben. Diese wurde dann eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Der zweite AK reagiert mit dem vorher gebildeten Immunkomplex und ist mit dem Enzym Biotin kovalent gebunden. Dieses Enzym setzt das Substrat Avidin in

Abhängigkeit zur Enzymkonzentration und damit zur IFN- $\gamma$ -Konzentration um. Nach einem weiteren Waschgang wurde Avidin in einer 1:1000-Lösung auf die wells der MTP gefüllt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Während des nächsten dreimaligen Waschganges wurde eine OPD-Tablette in 10 ml PBS aufgelöst. Der letzte Waschpuffer wurde in den wells belassen. Diesem wurde je 100  $\mu$ l der Mischung mit der aufgelösten OPD-Tablette, der kurz vor Gebrauch noch 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Perhydrol 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zugeführt wurden, hinzu pipettiert. Die MTP ließ man 30 Minuten mit einem Deckel abgedunkelt stehen, bis eine Reaktion in Form eines gelben Farbumschlages zu sehen war. Abschließend wurden je 100  $\mu$ l einer POD-Stopplösung jedem Napf zugefügt. Durch die photometrisch messbare Farbintensität konnte eine Aussage zum IFN- $\gamma$ -Titer der Proben gemacht werden.

### **2.2.5 Spot-Blot-Hybridisierung**

Um den Effekt der IL-12-Therapie auf die WHV-Replikation beurteilen zu können, wurde der WHV-DNA-Level im Serum mittels Spot-Blot-Hybridisierung semiquantitativ bestimmt. Diese Methode dient dem quantitativen Nachweis, ist allerdings weniger sensitiv als eine PCR (Nachweisgrenze ca. 10<sup>5</sup> Kopien/ml).

Auf eine Nitrozellulosemembran wurden je 5  $\mu$ l der Serum-Proben aufgetropft. Nach 10-minütiger Trocknungszeit wurde diese Nitrozellulosemembran nacheinander in drei verschiedene Lösungen für jeweils 10 Minuten gelegt. Die erste Lösung war eine Denaturierungslösung, die sich aus 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl zusammensetzte, danach folgte eine Neutralisierungslösung aus 2 M NaCl und 1 M Tris mit einem pH von 5,5 und die letzte war die 2 x SSPE-Lösung mit 0,36 M NaCl, 2 mM EDTA und 0,02 M Natriumphosphat. Nach dem Abkippen der letzten Lösung wurde die Membran von jeder Seite mit UV-Licht fixiert. Die Proben wurden mit einer WHV-spezifischen Sonde markiert, die mit p32 gelabelt wurde. Dies wurde 16 Stunden inkubiert und anschließend mehrfach gewaschen.

Anhand der Größe und Intensität der gefärbten Spots konnte die Virämie semiquantitativ abgelesen werden.

### **2.2.6 WHV Polymerase Ketten Reaktion (WHV-PCR)**

Um die Effekte des IFN- $\gamma$  nach der IL-12-Stimulation deutlich zu machen, wurde die Virämie in Form der WHV-DNA im Serum bei den Woodchucks #14622, #14623, #14624 und #14632 mit der Methode der WHV-PCR bestimmt. Die WHV-PCR zum Nachweis der Virämie ist rein qualitativ, aber im Vergleich zur Spot-Blot-Hybridisierung sensitiver (Nachweisgrenze ca.  $10^3$  Kopien/ml). Diese Versuche wurden freundlicherweise von der MTA Anja Mayer durchgeführt und für diese Dissertation zur Verfügung gestellt.

Zuerst wurde die DNA aus der Serumprobe mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit nach Angaben des Herstellers extrahiert. Danach erfolgte der Ansatz zur Amplifizierung des DNA-Stückes mit 8  $\mu$ l Wasser, 2  $\mu$ l  $MgCl_2$ , Primer, 2  $\mu$ l Nukleotiden, 2,5  $\mu$ l Puffer und 0,5  $\mu$ l Taq-Polymerase. Dieser Ansatz wurde zum Schutz vor Verdunstung mit einem Tropfen Mineralöl beschichtet, bevor 5  $\mu$ l der Probe mit der Spitze durch diese Schicht dem Ansatz zugefügt wurden. Die beiden Primer waren WC-1 (5'-TGG GGC CAT GGA CAT AGA TCC-3') und WC-2 (CAT TGA ATT CAG CAG TTG GCA GCA GG). Bei einer Temperatur von 94° wurde der Ansatz in den Zykler gestellt und für 10 Minuten belassen. Anschließend liefen in einer 30 Mal wiederholten Folge drei Schritte ab. Zur Aufspaltung des DNA-Doppelstranges fing der Zyklus mit 1 Minute bei 94° an, dann folgte 1 Minute bei der Annealingtemperatur von 65° zur Anheftung der Primer und zur Replizierung der primermarkierten DNA folgten als dritter Schritt 2 Minuten bei 72°. Nach den 30 Wiederholungen wurde die Probe noch einmal für 7 Minuten auf der Temperatur von 72° gehalten und danach auf 4° abgekühlt. Das Gel zur Darstellung der DNA-Banden wurde selber hergestellt. Dafür wurde 1 g Agarose mit 100 ml selbsthergestelltem TBE-Puffer aufgekocht und gut verrührt. Diesem Gemisch wurde noch 5  $\mu$ l Ethidiumbromid zugefügt, bevor es in eine Gelkammer gegossen wurde. Nach dem Abkühlen wurde in die

vorgefertigten Slots jeweils 5 µl selbsthergestellter Laufpuffer und 5 µl des PCR-Produktes gefüllt. In der Positivkontrolle werden 100 Standardbasenpaare zum Laufpuffer gegeben und in den linken Slot gefüllt. An das Gel wurde für 30 Minuten ein elektrisches Feld von 70 mA angelegt. Danach lassen sich die Banden unter UV-Licht sichtbar machen.

Phase	1. PCR	
Denaturieren	10 min bei 94°C	30 Zyklen
Denaturieren	1 min bei 94°C	
Annealing	1 min bei 65°C	
Elongation	2 min bei 72°C	
Delay	7 min bei 72°C	
Abkühlung	Auf 4°C	

*Abbildung 3: Ablauf der WHV-PCR*

### 2.2.7 SDH-Testung (Sorbitol-Dehydrogenase)

Im Serum der Testtiere wurde zusätzlich zu den schon genannten Versuchen mit dem Test der Firma Sigma Diagnostics SDH gemessen. SDH ist normalerweise nur zu einem geringen Anteil im Serum vorhanden. Der Anstieg dieses Leberenzym im Serum lässt auf eine Leberparenchymschädigung schließen, die bei unseren Testtieren durch die Infektion mit WHV induziert sein kann. Das Prinzip beruht auf der katalysierenden Wirkung des SDH bei der Reduktion von Fructose zu Sorbitol. Das dabei von NADH zu NAD oxidierte Koenzym wird mittels des Spektrophotometers gemessen.

## 2.2.8 Vorgehensweise

Um den Effekt von rhIL-12 auf die IFN-Produktion von naiven und chronisch WHV-infizierten Woodchucks zu überprüfen, wurden In-vitro- und In-vivo-Versuche durchgeführt. Die Woodchucks für diese Versuche wurden bei North Eastern Wildlife (Ithaca, NY) erworben. Die Experimente wurden geprüft und genehmigt durch das Zentrale Tierlabor Essen und die Bezirksregierung Düsseldorf.

### 2.2.8.1 *In-vitro-Vorversuche zur Dosisfindung von IL-12*

Für die Durchführung der In-vitro-Vorversuche wurden periphere Blutlymphozyten der naiven Woodchucks #880 und #881 wie unter 2.2.2 beschrieben aus dem Blut der Woodchucks durch eine Ficoll-Trennung gewonnen.  $1 \times 10^6$  Zellen/ml wurden zum einen mit 2  $\mu$ l PHA/ml allein stimuliert oder mit 2  $\mu$ l PHA/ml und zusätzlich noch unterschiedlichen Dosierungen rh oder rm IL-12 (zwischen 0,5 - 100 U/ml rm oder rh IL-12) und anschließend bei 37° mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Überstände dieser Zellen wurden nach drei Stunden als Nullwert und an den folgenden Tagen (Tag 2, 3, 5 und 7) abgenommen und bei – 20° asserviert. Dadurch soll zum einen die effektivste Konzentration an IL-12 auf die IFN-Produktion gefunden und der Effekt auf die Induktion von IFN durch rekombinantes murines IL-12 und rekombinantes humanes IL-12 verglichen werden.

### 2.2.8.2 *In-vitro-Versuche zum Vergleich der IFN-Produktion der peripheren Blutlymphozyten naiver und chronisch WHV-infizierter Woodchucks nach Stimulation mit IL-12*

In den folgenden In-vitro-Versuchen wurden zuerst die peripheren Blutlymphozyten sechs weiterer naiver Woodchucks mit der optimalen Dosis von rhIL-12 (50 U/ml) unter Kostimulation mit PHA (2  $\mu$ g/ml) oder ausschließlich mit PHA stimuliert. Die Überstände

dieser Zellen wurden an den Tagen 0, 2, 3 und 4 abgenommen, eingefroren und später im Bioassay auf den Interferongehalt getestet. In gleicher Weise wurden danach die Überstände der peripheren Blutlymphozyten chronisch WHV-infizierter Woodchucks auf den IFN-Gehalt getestet nach identischer Stimulation, entweder mit alleinigem PHA-Zusatz oder zusätzlicher rhIL-12-Stimulation in der optimalen Dosierung.

#### *2.2.8.3 In-vivo-Therapie chronisch WHV-infizierter Woodchucks mit IL-12*

Für die In-vivo-Experimente wurde sechs chronisch WHV-infizierten Woodchucks (#11562, #11563, #11566, #11569, #11573) über einen Zeitraum von drei Wochen insgesamt 10 x rhIL-12 in verschiedenen Dosierungen (0,5, 5 oder 25 µg/kg Körpergewicht) subkutan injiziert. Die Seren dieser Woodchucks wurden über den Behandlungszeitraum und die folgenden zehn Wochen regelmäßig abgenommen, eingefroren und später auf ihren Gehalt an IFN im Bioassay getestet. Einige Proben mit hohen IFN-γ-Werten wurden zusätzlich im Enzymimmunoassay (ELISA) getestet. Um den Effekt der IL-12-Therapie auf die WHV-Replikation genauer beurteilen zu können, wurde der WHV-DNA-Level im Serum über 13 Wochen mittels Spot-Blot-Hybridisierung bestimmt.

#### *2.2.8.4 Versuch der akuten Infektion*

Mit diesem Versuch sollte der Verlauf des IFN-Titers während Ablauf einer akuten Infektion gezeigt werden und zeitgleich dessen Einfluss auf die Virämie und das Ausmaß der Leberschädigung. Es wurden in diesem Versuch vier naive Woodchucks (#14622, #14623, #14624, #14632) akut mit WHV infiziert (mit  $10^6$  Kopien in 1 ml PBS Infektionsdosis). Dabei wurden kurz vor und während des Ablaufs einer Infektion über 9 Wochen Serumproben abgenommen, die sofort im Bioassay auf ihren IFN-Gehalt überprüft wurden. Veränderungen der Ergebnisse durch Einfrieren der Proben sollten so

ausgeschlossen werden. Mittels PCR und Spot-Blot-Hybridisierung wurde der WHV-DNA-Level bestimmt und zeitgleich auch der SDH-Spiegel als Zeichen einer Leberschädigung.



### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 *Bestimmung der optimalen IL-12-Dosis in vitro***

In verschiedenen Vorversuchen wurde die IL-12-Menge bestimmt, welche zu einer IFN- $\gamma$ -Produktion der peripheren Blutlymphozyten der Woodchucks führte. Die peripheren Blutlymphozyten der naiven Woodchucks #880 und #881 wurden dazu mit unterschiedlichen Konzentrationen IL-12 inkubiert.

Die Abbildungen 4 – 7 zeigen die im Bioassay gemessenen IFN-Werte. Für jedes Woodchuck gibt es zwei Abbildungen, eine mit den Kurven der IFN-Verläufe nach Stimulation mit den unterschiedlichen Konzentrationen an rekombinantem humanem IL-12 und ausschließlicher PHA-Stimulation und eine weitere mit den Kurven der IFN-Verläufe nach Stimulation mit den unterschiedlichen Konzentrationen an rekombinantem murinem IL-12 und PHA. Auf der y-Achse sind die reziproken Titerwerte angegeben und die x-Achse gibt den zeitlichen Verlauf wieder.

Bei Woodchuck #880 wurde am dritten Tag der Maximalwert des IFN-Titers von 1:1280 nach Stimulation mit 50 U/ml rIL-12 erreicht, welcher an Tag 5 mit 1:640 und an Tag 7 mit 1:960 wieder leicht abfiel. Beim gleichen Woodchuck wurde nach Stimulation der peripheren Blutlymphozyten mit 50 U/ml rhIL-12 an Tag 3 ein IFN-Titer von 1:800 gemessen, der auch an den Tagen 5 und 7 leicht sank (1:640). Die IFN-Titer bei Woodchuck #880 zeigten nach Stimulation mit 25 U/ml rhIL-12 an Tag 3 mit einem Titer von 1:640 den Maximalwert und an den Tagen 5 und 7 leicht niedrigere Werte. Damit lagen sie höher als nach Stimulation mit 100 U/ml rhIL-12. Diese Titer stiegen an den Tagen 3 – 7 auf 1:480 an. Nach Stimulation mit 100 U/ml rIL-12 lagen die IFN-Titer höher als bei gleicher Dosis rhIL-12 und betrugen an den Tagen 3 und 5 1:640 und am Tag 7 1:560, während sie bei Zusatz von 25 U/ml rIL-12 nicht über 1:320 zu messen waren. Stimulation mit geringeren Mengen IL-12, sei es mit rIL-12 oder rhIL-12 führten zu niedrigeren IFN-Titern. Nach ausschließlicher PHA-Stimulation wurden IFN-Basistiter

von maximal 1:240 erreicht. Diese waren damit niedriger als bei jeglichem Zusatz von IL-12.

Bei Woodchuck #881 wurden ähnliche IFN-Titer gemessen. Die Werte waren nach Stimulation mit 50 U/ml rIL-12 identisch mit denen bei Woodchuck #880. Dabei sind mit einem IFN-Titer von 1:1280 am Tag 3, 1:640 am Tag 5 und 1:960 am Tag 7 die höchsten Werte gemessen worden. Die Werte nach Stimulation mit 50 U/ml rhIL-12 betrugen an Tag 3 1:800, fielen dann an Tag 5 leicht ab auf 1:640 und an Tag 7 bis auf 1:480. Auch bei diesem Woodchuck konnte durch 100 U/ml rIL-12 oder rhIL-12 keine Steigerung des IFN-Titers bewirkt werden. Bei Zugabe der genannten Menge rIL-12 betrug der Maximalwert an den Tagen 3 und 5 1:640 und bei Zugabe dieser Menge an rhIL-12 konnte nur an Tag 5 ein messbarer Titer festgestellt werden (1:240). Nach Stimulation mit niedrigeren IL-12-Dosen wurden niedrigere IFN-Titer gemessen und auch bei diesem Woodchuck lagen die Titer bei alleiniger PHA-Gabe am niedrigsten bei Werten bis höchstens 1:40. Wie zu erwarten war in den Proben vor Stimulation beider Tiere keine IFN-Produktion nachweisbar.

Die deutlichste IFN-Produktion wurde nach Stimulation mit 50 U/ml rIL-12 erreicht, fast ebenso hohe Werte erreichte man nach Stimulation durch 50 U/ml rhIL-12. Die höchsten Konzentrationen an IFN wurden an Tag 3 gemessen bei beiden Woodchucks, danach war der induzierte IFN-Gehalt leicht rückläufig bis zum Ende der Messungen an Tag 7.

In den weiteren Versuchen wird 50 U/ml rhIL-12 verwendet, auch wenn die IFN- $\gamma$ -Stimulation mit 50 U/ml rIL-12 geringfügig höher war. Die Verwendung von rhIL-12 bietet Vorteile im Hinblick auf die spätere Übertragbarkeit auf Untersuchungen am Menschen.



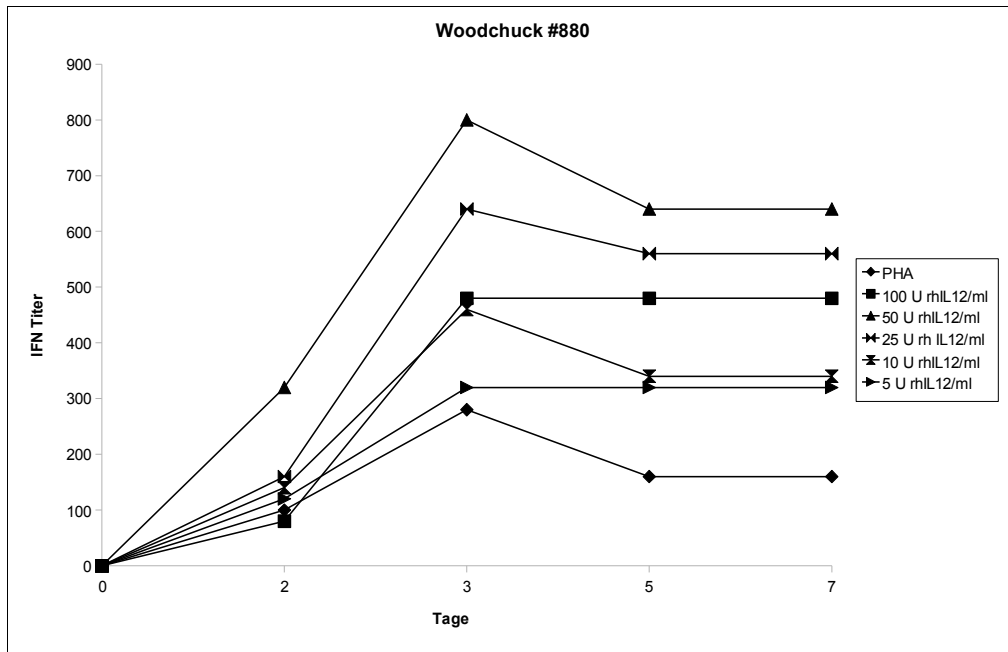


Abbildung 4: Ergebnisse von Woodchuck #880 nach Stimulation der peripheren Blutlymphozyten mit rekombinantem humanem IL-12

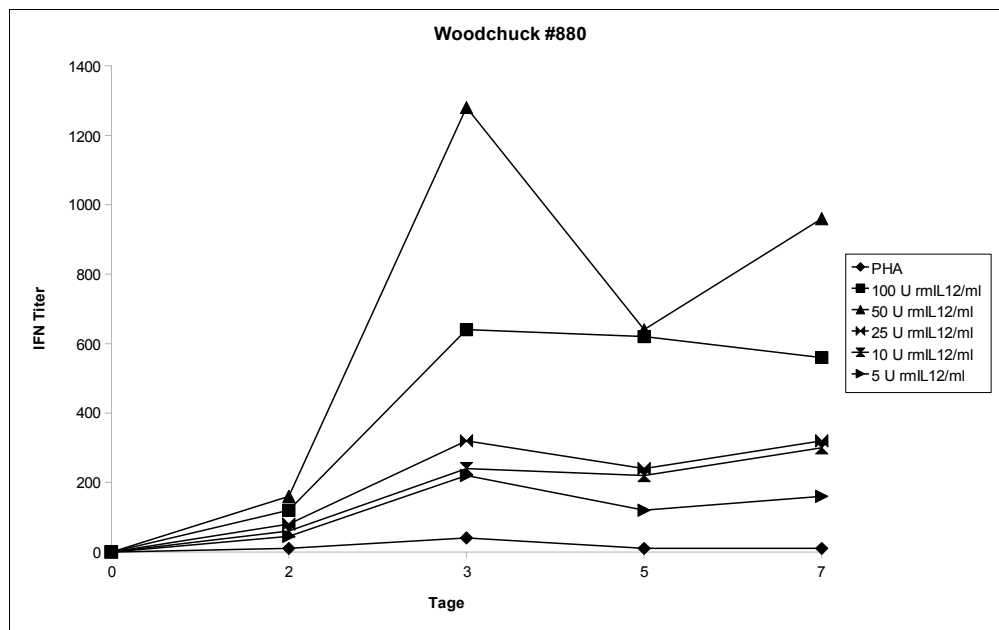


Abbildung 5: Ergebnisse von Woodchuck #880 nach Stimulation der peripheren Blutlymphozyten mit rekombinantem murinem IL-12

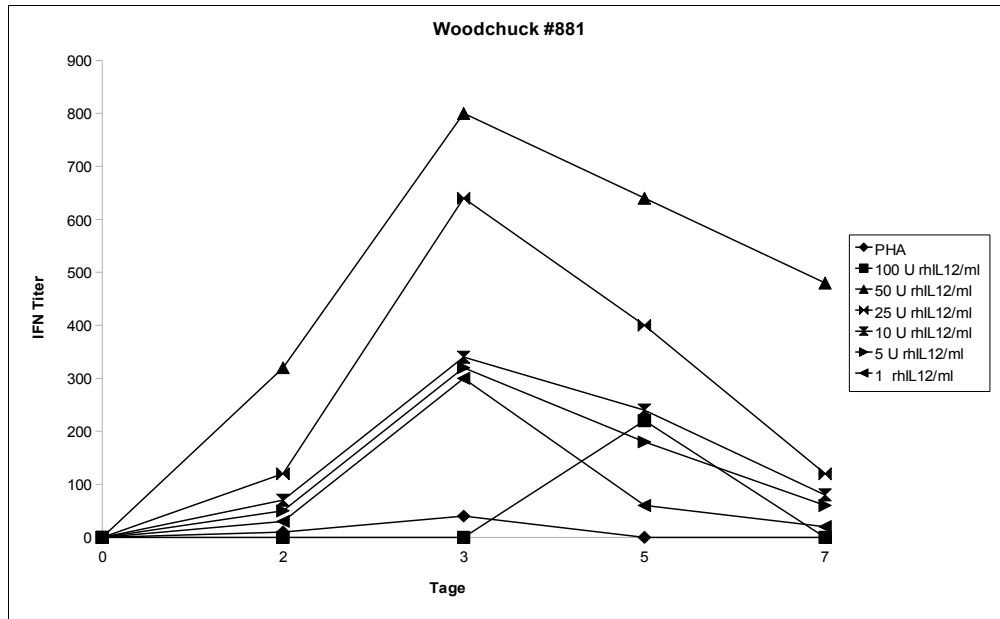


Abbildung 6: Ergebnisse von Woodchuck #881 nach Stimulation der peripheren Blutlymphozyten mit rekombinantem humanem IL-12

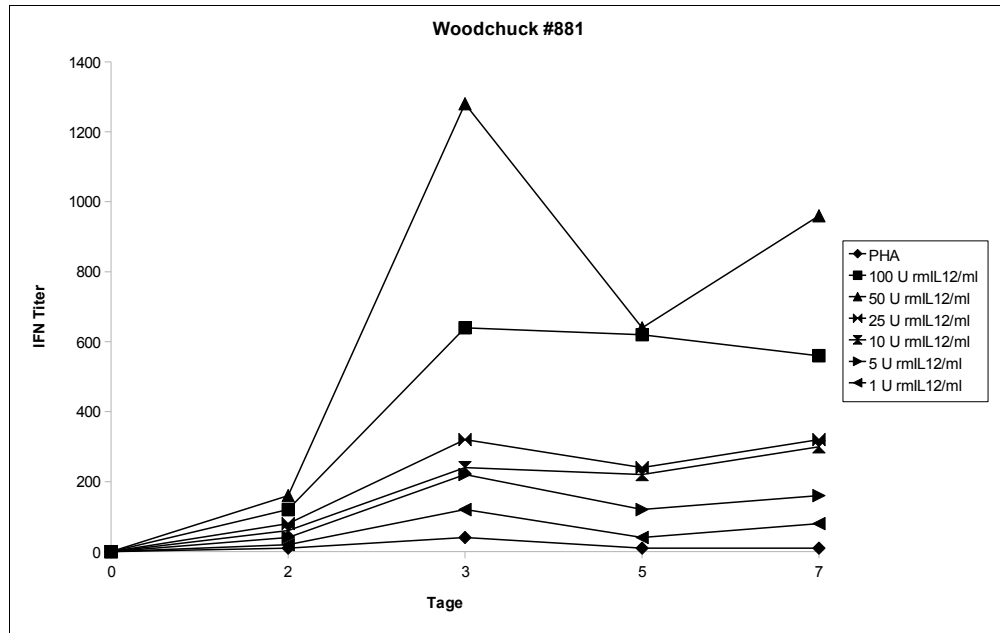


Abbildung 7: Ergebnisse von Woodchuck #881 nach Stimulation der peripheren Blutlymphozyten mit rekombinantem murinem IL-12

### **3.2 IFN-Produktion der peripheren Blutlymphozyten naiver Woodchucks nach In-vitro-Stimulation mit 50 U/ml rhIL-12**

Um die IFN-Produktion von peripheren Blutlymphozyten naiver Woodchucks nach IL-12-Stimulation näher zu charakterisieren, wurden die peripheren Blutlymphozyten von sechs weiteren naiven Woodchucks mit der in 3.1. gefundenen optimalen Dosis von 50 U/ml rhIL-12 stimuliert.

Die folgenden Abbildungen 8 – 13 zeigen die im Bioassay gemessenen IFN-Werte der Überstände der stimulierten peripheren Blutlymphozyten der sechs WHV-negativen Woodchucks (#13198, #13199, #13200, #13204, #13207 und #13208). Bei allen sechs Woodchucks lässt sich ein deutlich höherer IFN-Titer nach zusätzlicher IL-12-Stimulation im Vergleich zur ausschließlichen PHA-Stimulation messen. Der IFN-Titer nach Stimulation mit 50 U/ml rhIL-12 lag je nach Woodchuck 2 bis 7 Titerstufen über dem nach alleiniger PHA-Stimulation. Die Titer nach ausschließlicher PHA-Stimulation waren bei fast allen getesteten Überständen der peripheren Blutlymphozyten sehr niedrig und reichten von nicht nachweisbar bis zu einem Titer von 1:160. Bei Woodchuck #13198 kommt es nach IL-12-Stimulation zu steigenden Titerwerten von IFN bis zu dem Maximalwert an Tag 4 von 1:2560. An Tag 2 liegt der reziproke Wert bei diesem Woodchuck bei 1280 und an Tag 3 bei 1920. Bei diesem Woodchuck ist IFN nach PHA-Zusatz allein nur bis zu einer Verdünnung von maximal 1:160 nachweisbar. Bei Woodchuck #13199 wird der höchste IFN-Titer an Tag 3 mit dem reziproken Wert von 640 induziert, während die Werte unter PHA-Zusatz unter 80 bleiben. Bei Woodchuck #13200 ist IFN nach PHA-Zusatz allein nicht nachweisbar. Nach IL-12-Stimulation ist IFN bei diesem Tier an den Tagen 2 und 3 bis zu einer Verdünnung von 1:480 und an Tag 4 bis zu einer Verdünnung von 1:1280 nachweisbar. Bei Woodchuck #13204 sind an den Tagen 2, 3 und 4 nach PHA-Zusatz reziproke IFN-Titerwerten von 160 messbar, allerdings sind auch hier die Werte nach IL-12-Stimulation höher und liegen an Tag 2 und 3 bei 640, an Tag 4 bei 2560. Auch bei Woodchuck #13207 liegen die IFN-Titer in den Überständen der IL-12-stimulierten Zellen mit dem höchsten Wert von 1:1280 an Tag 3

höher als die Titer der Überstände der PHA-stimulierten Zellen mit dem Maximalwert von 1:120 an Tag 4. Bei Woodchucks #13208 liegen die Werte des IFN-Titer unter IL-12-Behandlung ebenfalls über den Werten der IFN-Titer nach PHA-Stimulation (Maximalwerte an Tag 4 mit Titern von 1:1280, bzw. 1:2560). An den vorherigen Tagen 2 und 3 bleibt der IFN-Titer nach alleiniger PHA-Stimulation sehr niedrig bei 1:80, während er nach zusätzlicher IL-12-Gabe an beiden Tagen bei 1:1280 liegt und damit deutlich über den IFN-Werten nach PHA-Gabe allein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei den peripheren Blutlymphozyten der naiven Woodchucks eine Stimulation mit zusätzlichem rhIL-12 zu einer deutlich stärkeren IFN-Produktion geführt hat als die PHA-Stimulation allein. Das zeigt ein maximaler IFN-Titer von 1:2560 an Tag 4 bei drei Woodchucks (#13198, #13204 und #13208). Die gemessenen IFN-Titer unter alleiniger PHA-Stimulation erreichten maximal 1:160 mit einer Ausnahme. Diese Tendenz ist bei allen sechs getesteten Woodchucks zu sehen. Die Unterschiede in der Höhe der IFN-Werte und der Verläufe ist auf die Individualität der Testtiere zurückzuführen.

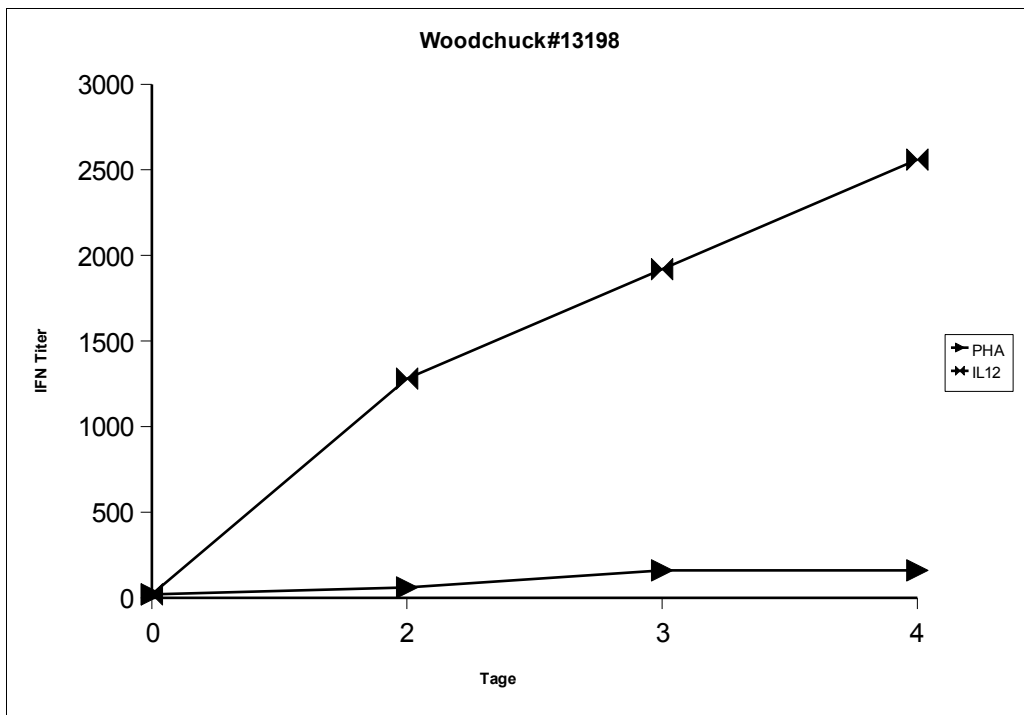


Abbildung 8: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #13198

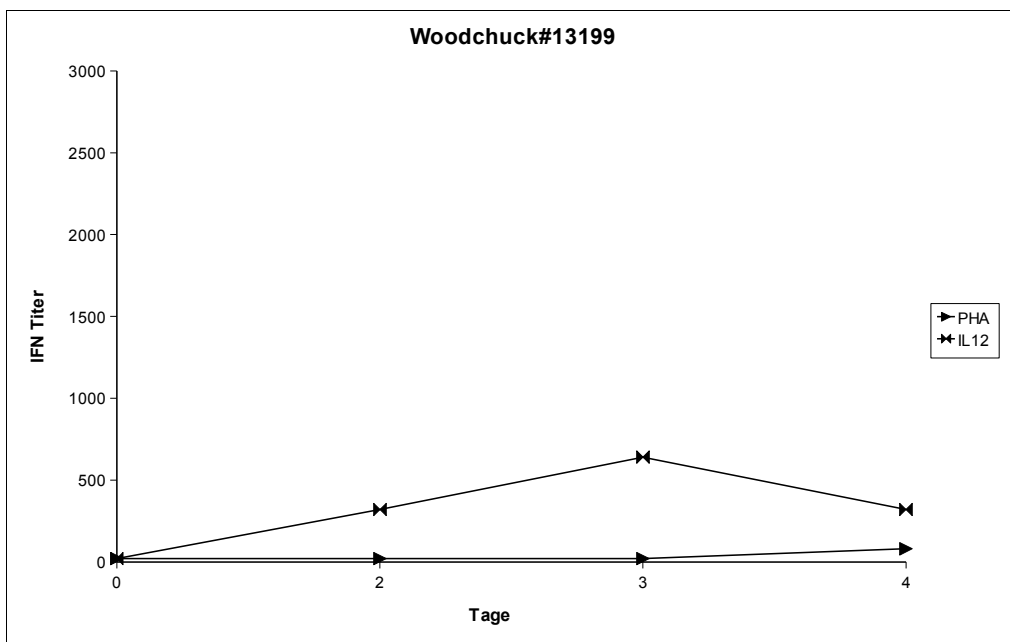


Abbildung 9: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #13199



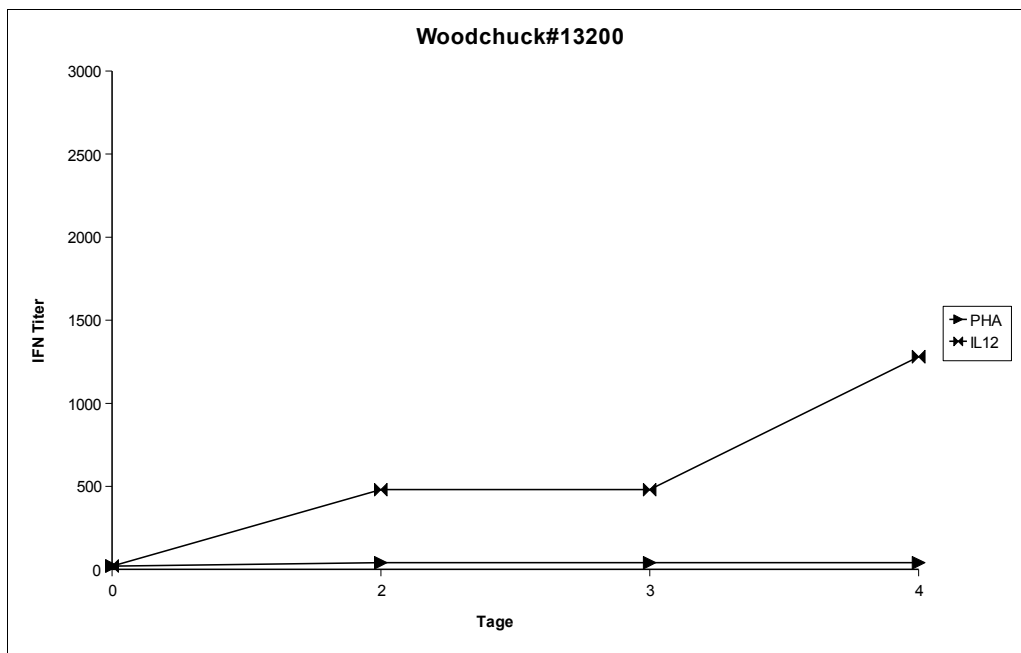


Abbildung 10: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #13200

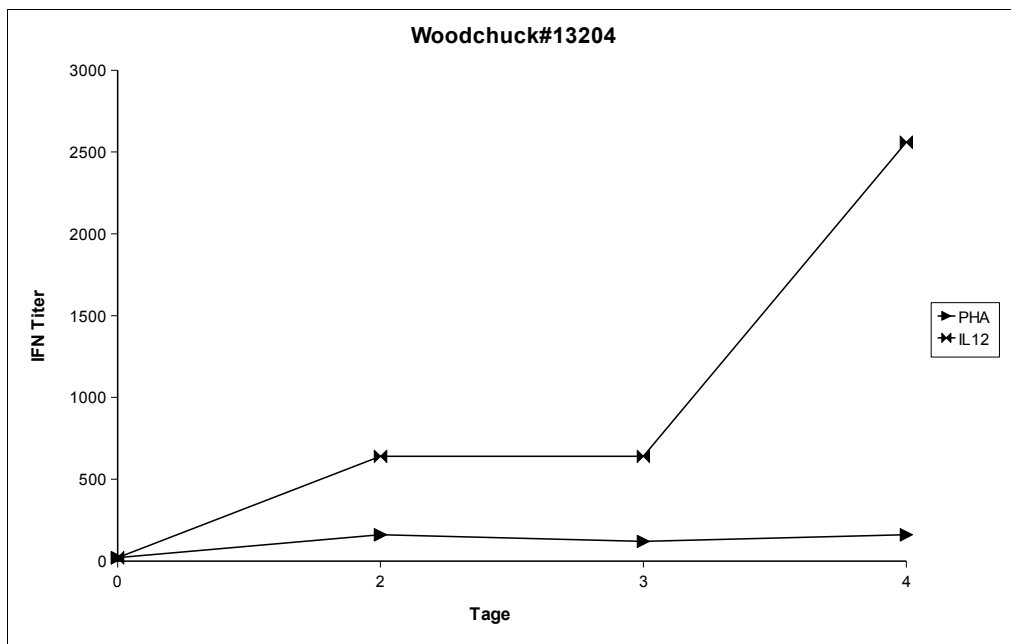


Abbildung 11: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #13204

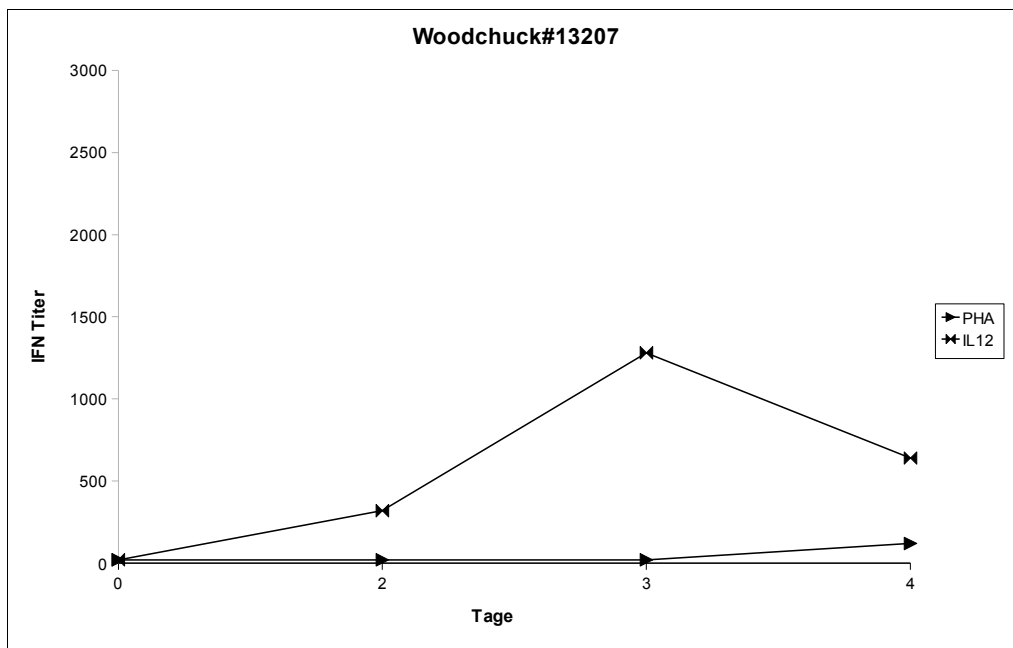


Abbildung 12: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #13207



Abbildung 13: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #13208

### **3.3 IFN-Produktion der peripheren Blutlymphozyten chronisch WHV-infizierter Woodchucks nach In-vitro-Stimulation mit 50 U/ml rhIL-12**

In einem weiteren Versuch wurde die IFN-Produktion der peripheren Blutlymphozyten chronisch WHV-infizierter Woodchucks nach IL-12-Stimulation untersucht. Die IFN-Titer, der einmal nur mit PHA und einmal mit PHA und 50 U/ml rhIL-12 stimulierten peripheren Blutlymphozyten der chronisch infizierten Woodchucks #11562, #11563, #11564, #11566, #11569 und #11573 sind in den folgenden Abbildungen 14 - 19 wiedergegeben. Insgesamt lässt sich feststellen, dass zwar bei allen sechs Woodchucks IFN gebildet wurde, aber die Unterschiede der IFN-Titer zwischen alleiniger PHA-Stimulation und zusätzlicher IL-12-Stimulation nicht so deutlich sind wie nach IL-12-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten naiver Woodchucks (s.o. unter 3.2). Die reziproken IFN-Titer bei Woodchuck #11563 und #11564 sind an den Tagen 3 und 4 unter beiden Behandlungen identisch, mit Werten von jeweils 640 bei Woodchuck #11563 und von jeweils 1280 bei Woodchuck #11564, wohingegen bei Woodchuck #11562 ein geringer Unterschied mit einem höheren Titer nach zusätzlicher IL-12-Gabe gemessen wurde. Dieser lag nach PHA-Stimulation an Tag 3 bei 1:320 und an Tag 4 bei 1:640, während er nach IL-12-Stimulation an Tag 3 auf 1:640 und an Tag 4 auf 1:960 anstieg. Bei Woodchuck #11566 und #11573 ist ein höherer IFN-Titer gemessen worden nach alleinigem PHA-Zusatz als nach kombinierter PHA- und IL-12-Gabe. Der maximale Wert nach PHA-Stimulation bei beiden Woodchucks (#11566 und #11573) lag bei 1:1280 an Tag 3 und fiel an Tag 4 wieder auf 1:640 ab, während er nach IL-12-Stimulation an beiden Tagen 1:640 betrug. Bei Woodchuck #11569 war ein IFN-Titer weder nach PHA noch nach kombinierter Gabe mit IL-12 im Bioassay messbar.

Einige Überstände von Woodchucks, bei denen ein hoher IFN-Titer im Bioassay getestet wurde, wurden außerdem noch in dem von Dr. Lohrengel und Dr. Lu etablierten ELISA untersucht. Der IFN-Titer, der im ELISA getestet wurde, war ca. zwei Titrationsstufen

niedriger als vorher im Bioassay. Aufgrund der dadurch gezeigten geringeren Sensitivität des ELISAs gegenüber dem Bioassay wurde er im Folgendem nicht weiter verwendet.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit den peripheren Blutlymphozyten naiver Woodchucks induziert die zusätzliche IL-12-Stimulation von den peripheren Blutlymphozyten chronisch WHV-infizierter Woodchucks keine höheren IFN-Werte. Stimulation mit PHA allein induziert bei den peripheren Blutlymphozyten chronisch WHV-infizierter Woodchucks bereits höhere IFN-Titer als im Vergleichsversuch mit den peripheren Blutlymphozyten naiver Tiere.

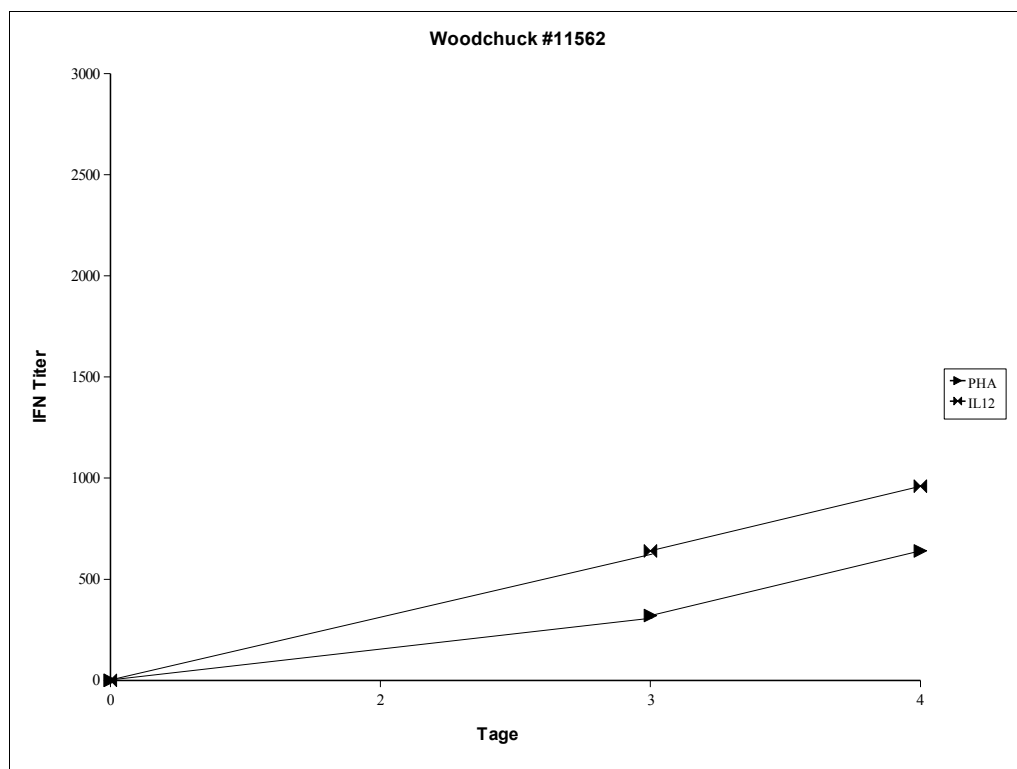


Abbildung 14: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #11562

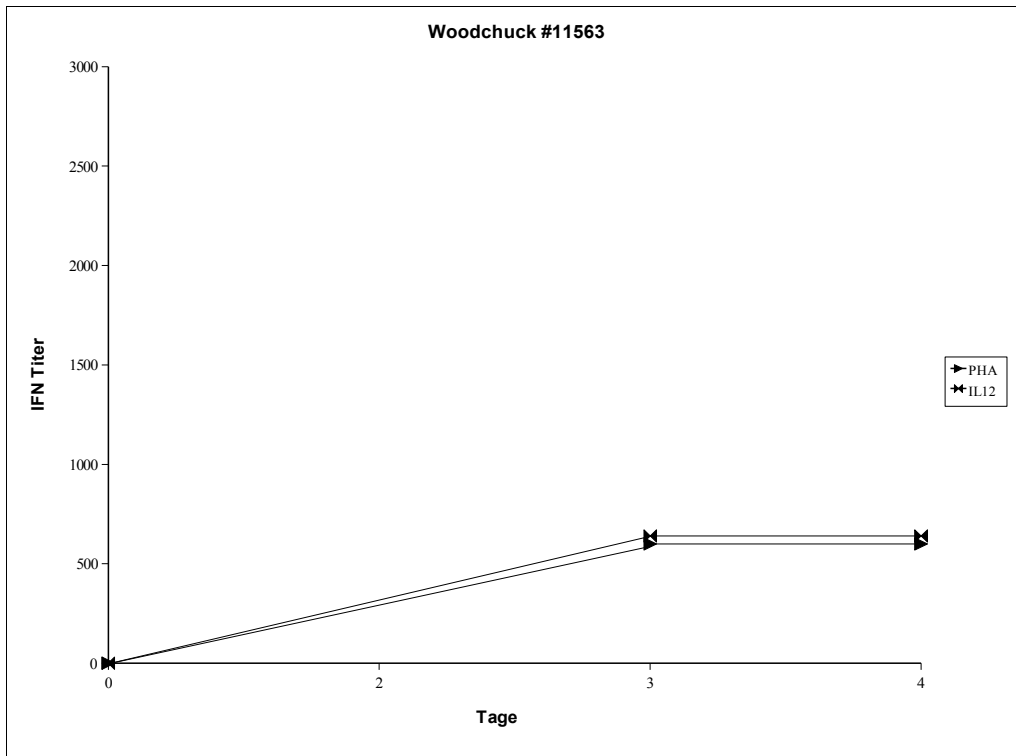


Abbildung 15: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #11563

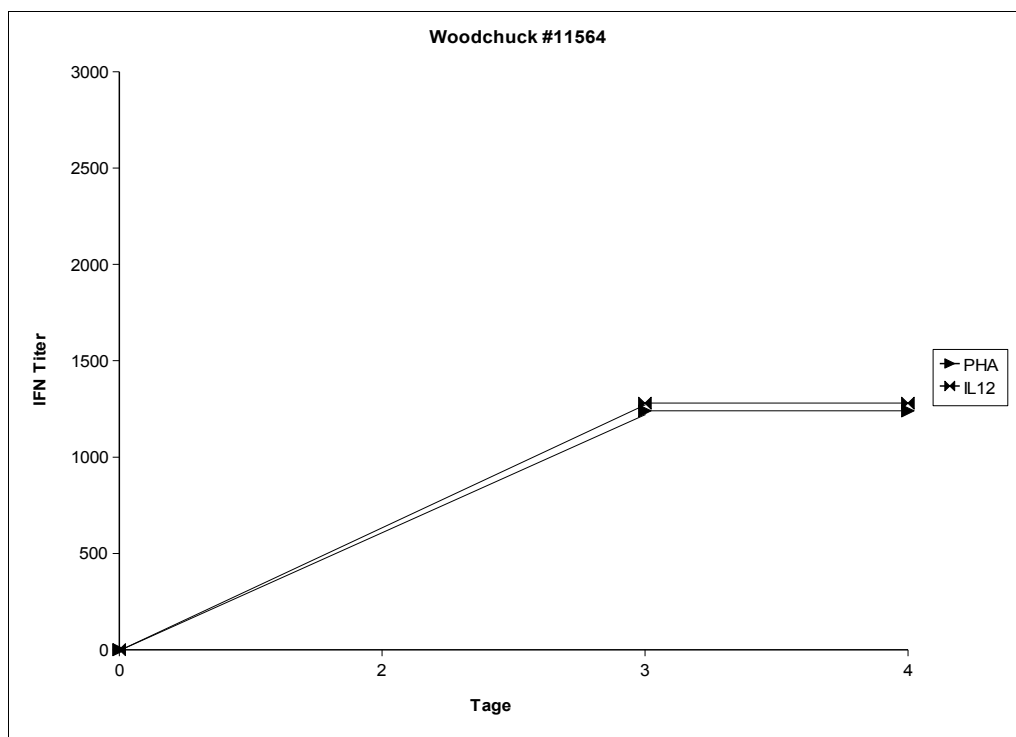


Abbildung 16: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #11564

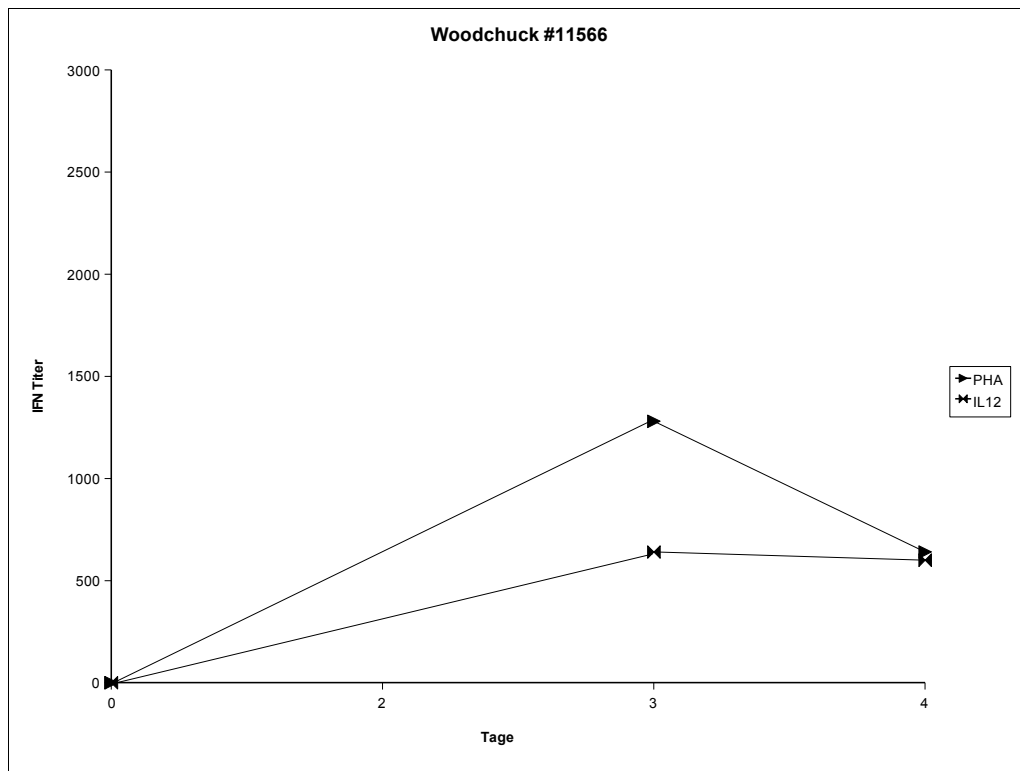


Abbildung 17: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #11566

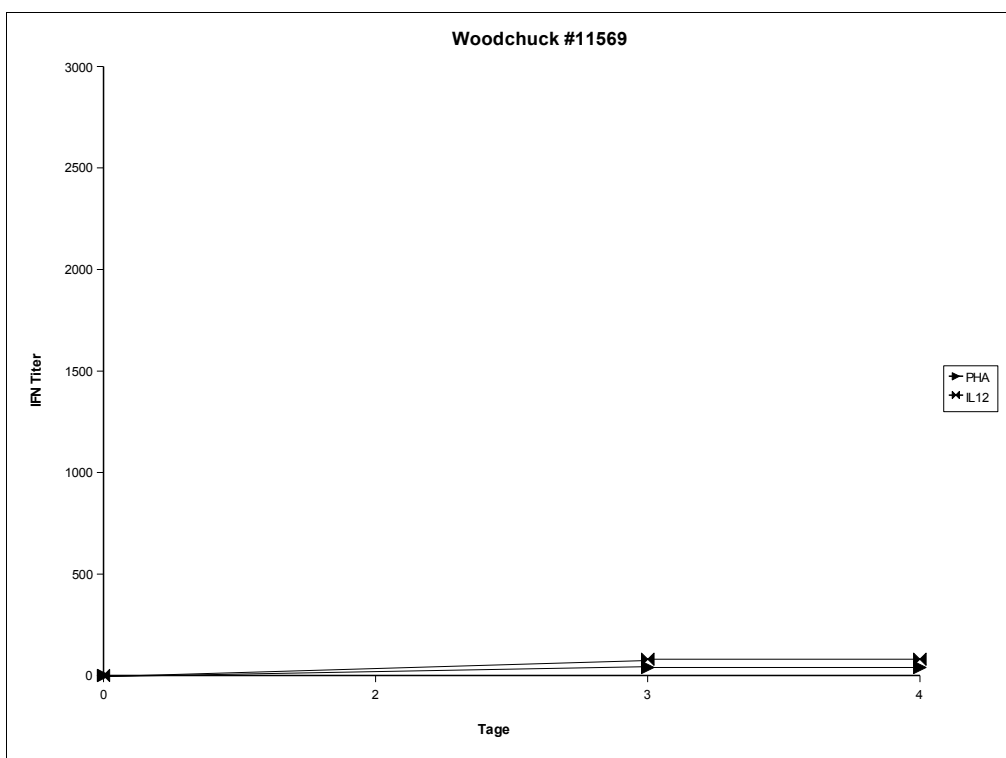


Abbildung 18: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #11569

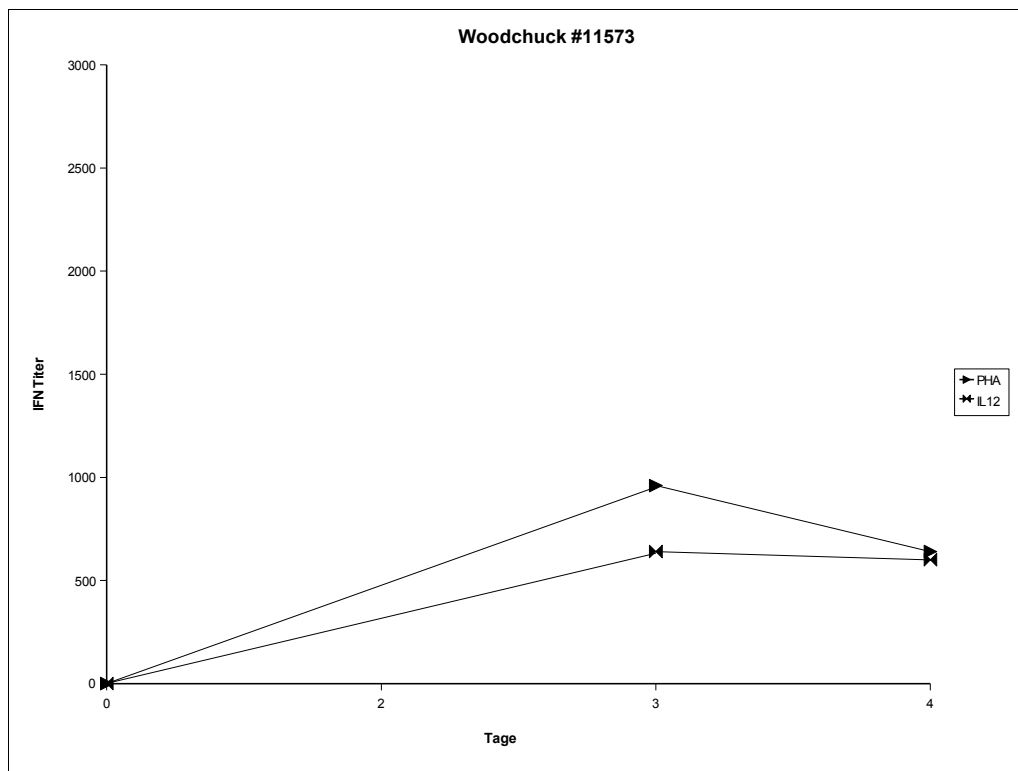


Abbildung 19: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #11573

### 3.4 In-vivo-Stimulation chronisch WHV-infizierter Woodchucks mit rhIL-12

Fünf der schon genannten sechs chronisch WHV-infizierten Woodchucks wurden auch in vivo einer IL-12-Therapie unterzogen. Trotz geringer Stimulierbarkeit der peripheren Blutlymphozyten dieser Tiere im In-vitro-Versuch war ein Einfluss der IL-12-Therapie auf die Virämie in vivo nicht auszuschließen. Die IL-12-Therapie kann neben den peripheren Blutlymphozyten weitere Immunzellen, wie z. B. NK-, CD8+-Zellen, sowie die Ausschüttung weiterer Zytokine (z.B. IL-2) aktivieren. Eine Induktion dieser zusätzlichen Immunmodulatoren könnte in vivo den Verlauf der Virämie beeinflussen.

Im Versuch wurden die Woodchucks in drei Gruppen aufgeteilt und mit unterschiedlichen Dosierungen (0,5, 5 oder 25 µg/kg KG) rhIL-12 stimuliert. Diese wurden subkutan injiziert. Die fünf Woodchucks bekamen ihre Dosis über einen Zeitraum von 20 Tagen jeden zweiten Tag insgesamt zehn Mal verabreicht. Woodchuck #11562 bekam 25 µg rhIL-12/kg KG gespritzt, während die Woodchucks #11563 und #11573 je 5 µg rhIL-12/kg KG injiziert bekamen und die beiden Woodchucks #11566 und #11569 je 0,5 µg rhIL-12/kg KG.

Die Seren wurden über den Behandlungszeitraum und die folgenden zehn Wochen abgenommen, bei -20 °C gelagert und später in dem unter 2.2. beschriebenen Bioassay auf ihren IFN-Gehalt getestet. In diesem Assay war kein Schutz vor der EMCV-Infektion messbar. Es konnte also kein IFN-γ- oder IFN-α-Gehalt der Serumproben im Bioassay festgestellt werden. Dies könnte auf zelltoxische Substanzen im Serum zurückzuführen sein. Besonders bei niedrigen Verdünnungen, in denen IFN noch zu detektieren gewesen wäre, wären diese toxischen Substanzen in höherer Konzentration in der Serumprobe vorhanden. Zum Ausschluss dieser Problematik wurde eine Serumprobe mit rekombinantem woodchuck (rw)IFN-γ gespiked und dann im Bioassay getestet. Dabei konnte IFN-γ in niedrigen Titern nachgewiesen werden, was gegen die Zelltoxizität der Serumbestandteile spricht.

Um einen Einfluss der Therapie auf die Virämie zu untersuchen, wurden Spot-Blot-Hybridisierungen durchgeführt. Bei der Bestimmung der Viruslast während und nach der IL-12-Therapie konnte zwar eine Fluktuation, aber keine deutliche Reduktion der Virämie gemessen werden (s. Abb. 20). In den ersten drei Wochen nach Therapiebeginn ist bei allen Woodchucks die stärkste Fluktuation der WHV-DNA-Level zu sehen. Diese beträgt maximal ca. ½ log-Stufe. Bei Woodchuck #11562 ist ein Anstieg der Viruslast in der zweiten Woche gemessen worden. Die WHV-DNA-Level erreichten im Verlauf der neun Wochen wieder das gleiche Niveau wie zu Beginn der Therapie. Dieses Tier erhielt IL-12 in der höchsten Dosierung von 25 µg/kg KG. Bei Woodchuck #11573 (5 µg/kg KG) ist zu Beginn der Therapie der niedrigste WHV-DNA-Wert gemessen worden, welcher in den



ersten drei Wochen bis auf einen Maximalwert ansteigt, um in den folgenden Wochen des Beobachtungszeitraumes auch wieder auf den Ausgangswert abzufallen. Die WHV-DNA-Level der Woodchucks #11566 und #11569 sind während des gesamten Beobachtungszeitraums von zehn Wochen ziemlich konstant und schwanken nur minimal. Diese beiden Tiere wurden mit 0,5 µg IL-12/kg KG behandelt. Einzig bei Woodchuck #11563 (5 µg IL-12/kg KG) fielen die WHV-DNA-Level innerhalb der ersten drei Wochen vorübergehend um ca.  $\frac{1}{2}$  log-Stufe ab und erreichten in Woche 4 wieder das Ausgangsniveau.

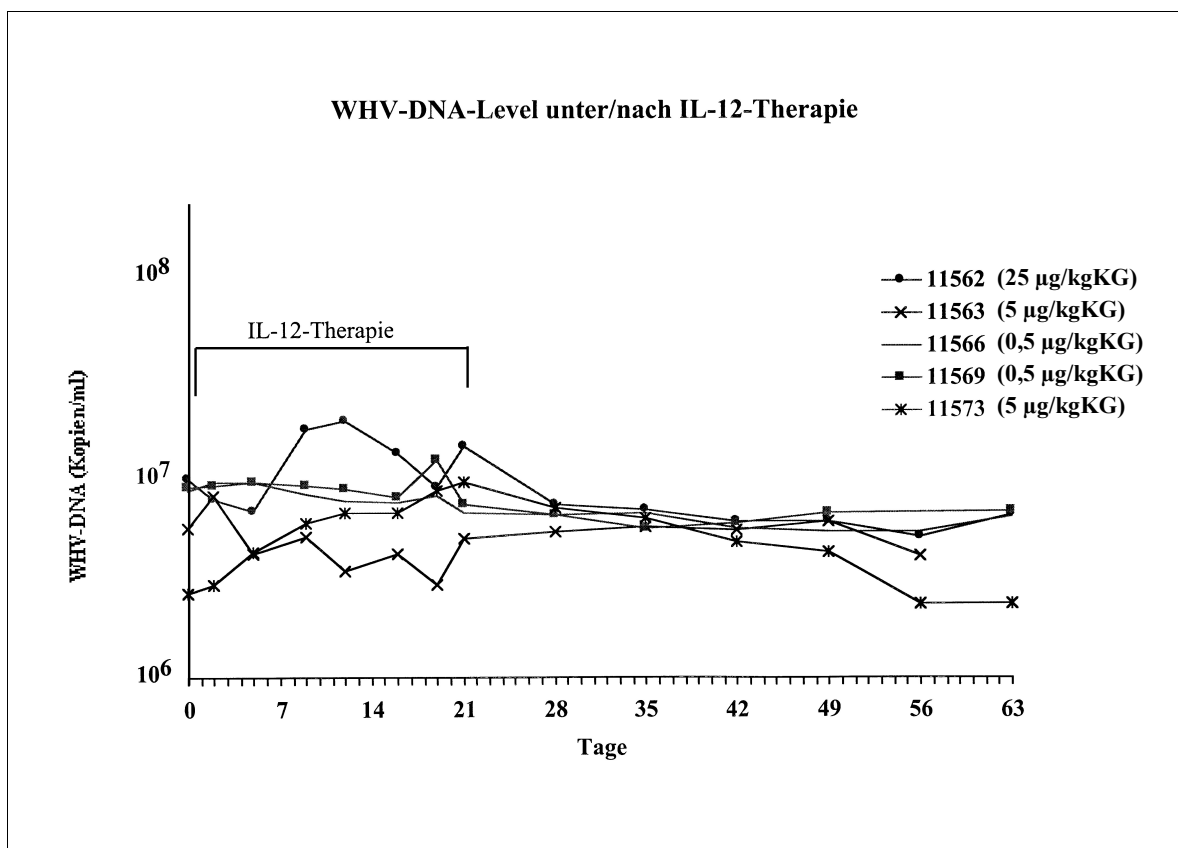


Abbildung 20: WHV-DNA-Level während/nach IL-12-Therapie

Ab der dritten Woche bis zum Ende des Beobachtungszeitraums waren die WHV-DNA-Level aller beobachteten Woodchucks fast identisch zum Level vor Therapie. Die Behandlung der Woodchucks mit IL-12 zeigte in den In-vivo-Versuchen keinen deutlichen therapeutischen Effekt im Sinne einer Reduktion der Virämie, aber eine deutliche

Fluktuation der WHV-DNA-Kopien unter IL-12-Therapie in den höheren Dosierungen (5 oder 25 µg/kg KG) ist auffällig.

Unter der IL-12-Therapie in den drei oben genannten Dosierungen kam es bei diesen Woodchucks zu keinen sichtbaren Nebenwirkungen.

### **3.5 *IFN- $\gamma$ -Produktion während akuter WHV-Infektion***

Das Ziel dieses Versuchs ist die Untersuchung und Charakterisierung des Verlaufs sowohl der Virämie als auch der IFN-Produktion und der Leberschädigung während akuter WHV-Infektion. Dazu wurden vier Woodchucks akut mit WHV infiziert und wöchentlich deren Serumproben auf WHV-DNA, IFN und SDH untersucht. Der Verlauf der Virämie wurde während akuter Infektion mittels Messung der WHV-DNA dargestellt und das Ausmaß der Leberschädigung mittels Bestimmung von SDH. Außerdem wurden die Serumproben direkt im Bioassay auf IFN untersucht. Dadurch sollte zum einen ein systematischer Messfehler in den vorherigen Tests durch Einfrieren ausgeschlossen werden und zum anderen sollte die Effizienz der IFN-Testung mit dem Bioassay gezeigt werden.

Die Abbildungen 21 – 24 fassen den Verlauf der akuten Infektion der Woodchucks #14622, #14623, #14624 und #14632 zusammen. Dargestellt sind für jedes Woodchuck die im Bioassay gemessenen IFN-Werte als reziproke Titer und die SDH-Werte in U/l als Kurve im Verlauf von 9 bzw. 13 Wochen nach Infektion, sowie der Verlauf der Virämie mit den Ergebnissen der WHV-Spot-Blot-Hybridisierung und der WHV-PCR.

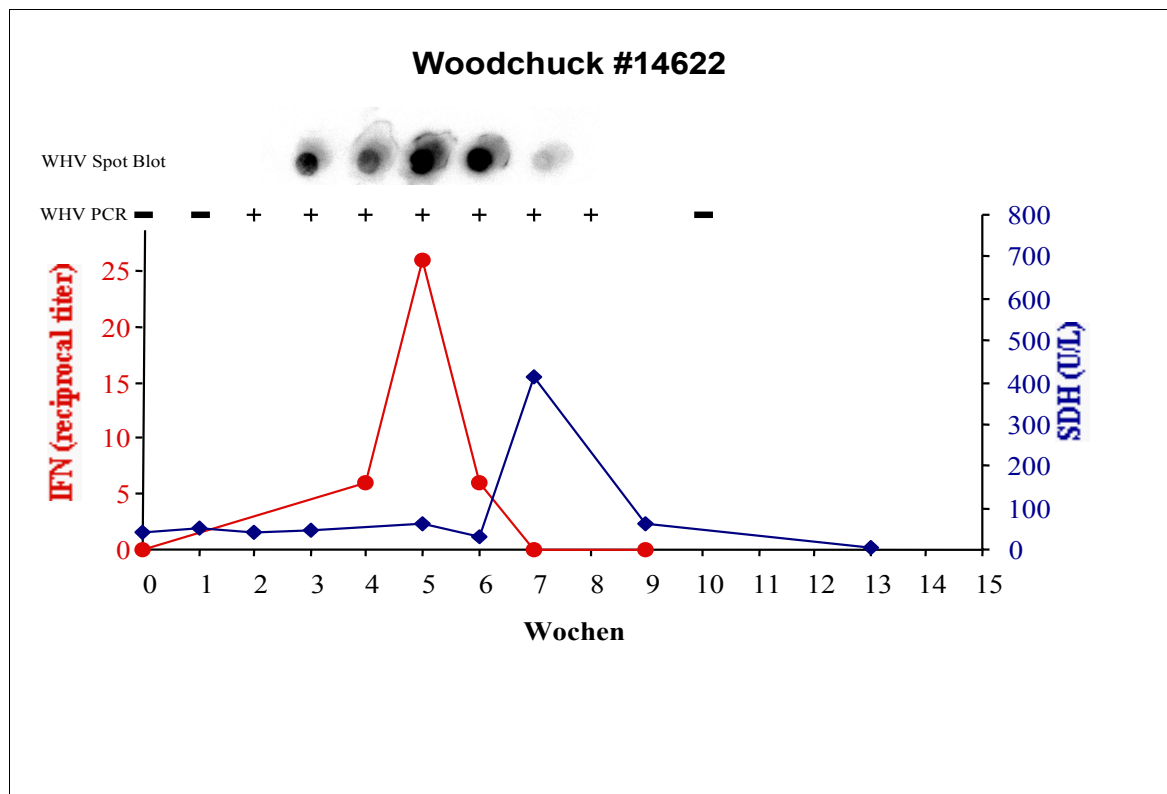


Abbildung 21: WHV-Infektionsverlauf bei Woodchuck #14622

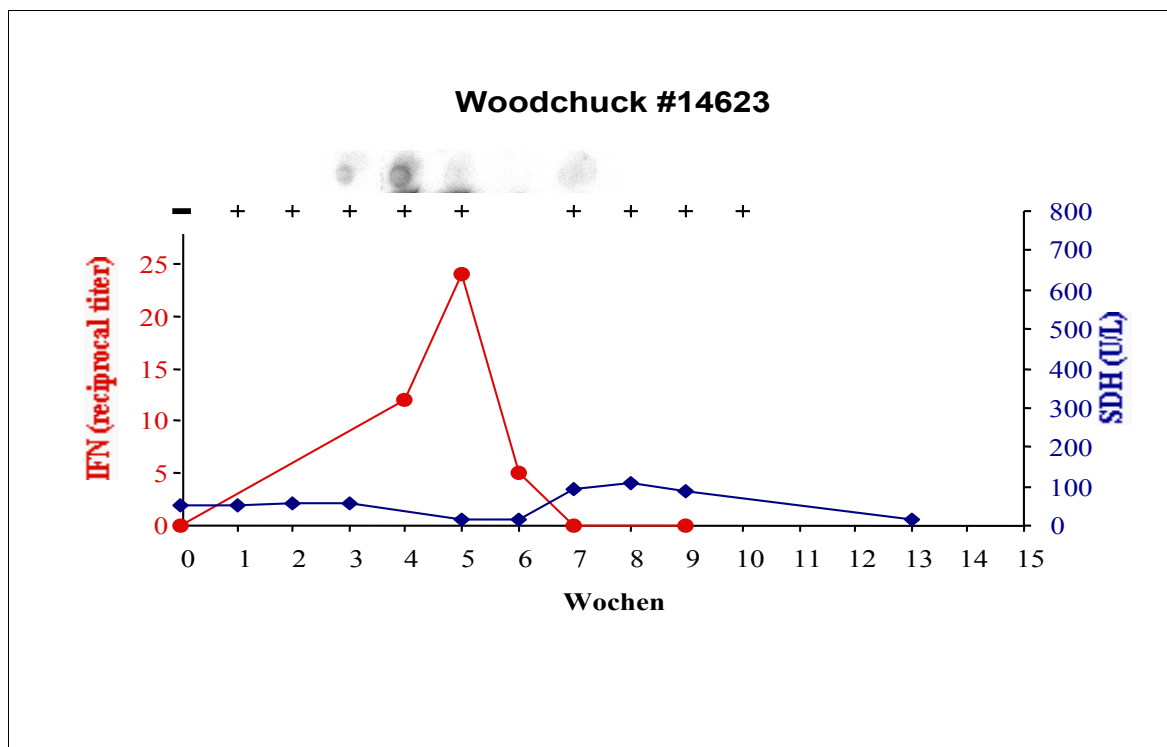


Abbildung 22: WHV-Infektionsverlauf bei Woodchuck #14623

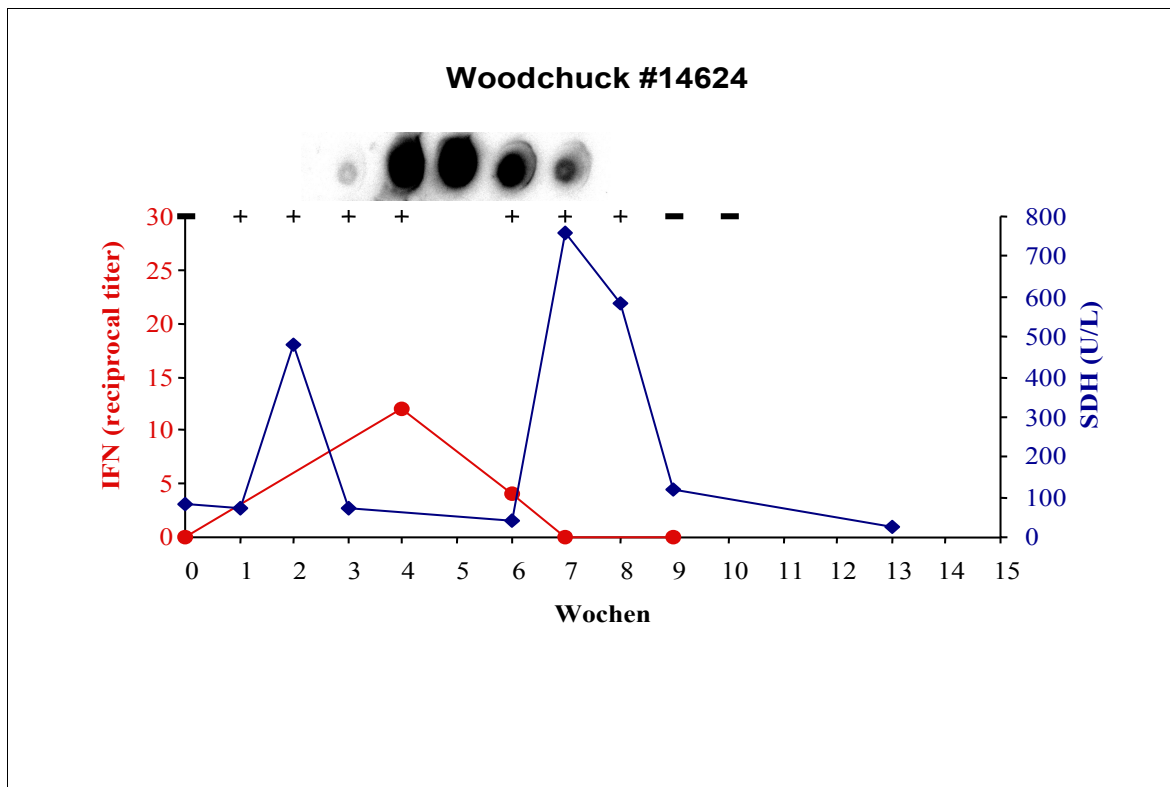


Abbildung 23: WHV-Infektionsverlauf bei Woodchuck #14624

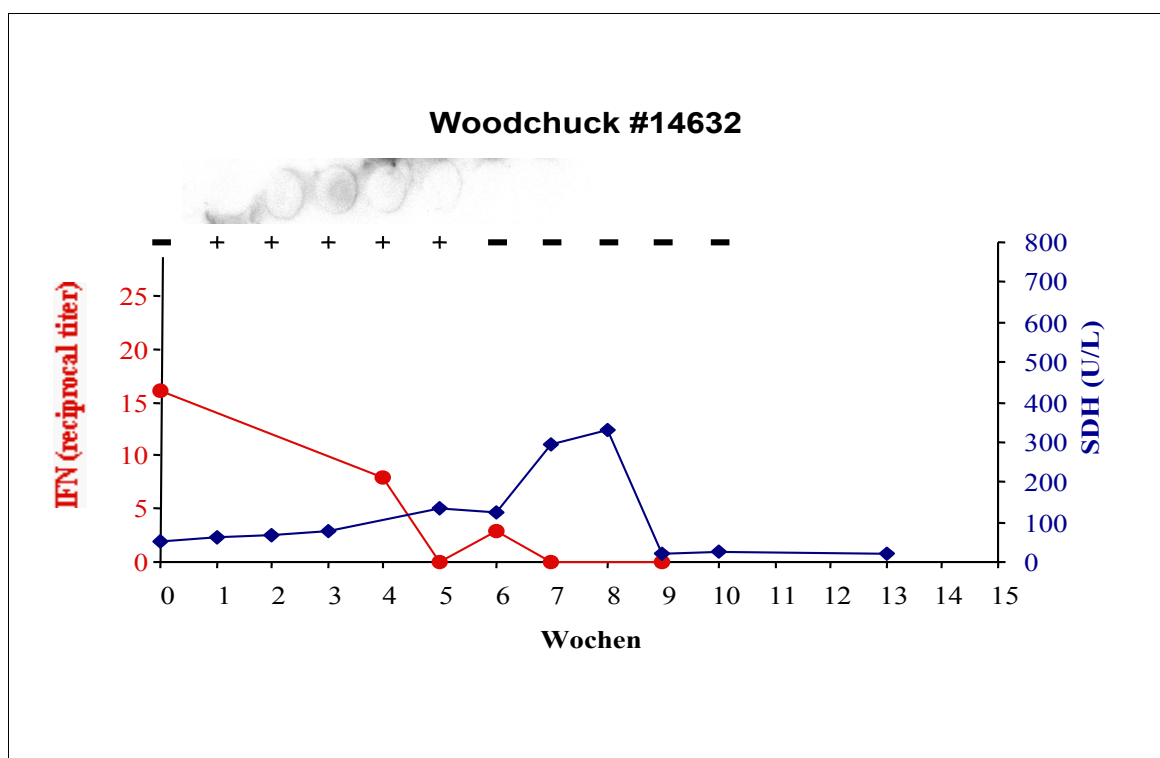


Abbildung 24: WHV-Infektionsverlauf bei Woodchuck #14632

Bei Woodchuck #14622 ist mittels PCR die Virus-DNA in Woche 2 nach Infektion, eine Woche vor dem Nachweis in der Spot-Blot-Untersuchung nachweisbar. Des Weiteren bleibt die DNA mit der PCR eine Woche länger detektierbar (bis Woche 8) als mit der Spot-Blot-Hybridisierung. Parallel zur höchsten Viruslast in Woche 5 kann man den IFN-Peak mit einem reziproken Titer von 26 erkennen. Kurz darauf ist ein Abfall der Virämie in der 7. Woche in der Spot-Blot-Untersuchung nachweisbar. Gleichzeitig mit dem Abfall der Virämie in der Spot-Blot-Untersuchung steigt in der 7. Woche das SDH im Serum an, was als Zeichen der Leberschädigung durch die Immunantwort gedeutet werden kann.

Bei Woodchuck #14623 lässt sich in der Spot-Blot-Hybridisierung keine hohe Virämie darstellen. Allerdings bleibt die WHV-DNA durch die PCR über die 10. Woche hinaus nachweisbar. Man sieht den IFN-Peak mit dem reziproken Titer von 24 ebenfalls in der 5. Woche. Bei diesem Woodchuck kommt es jedoch im Vergleich zu den anderen drei Tieren, welche alle Werte von über 300 U/L SDH im Serum erreichen, zu keinem bedeutenden Anstieg der SDH-Werte. Dies könnte für eine unzureichende Immunantwort sprechen. Damit korreliert auch der weitere Verlauf bei diesem Tier, der durch eine sehr lang anhaltende Virämie geprägt war.

Bei Woodchuck #14624 lässt sich durch Spot-Blot-Hybridisierung ab der 3. Woche nach Infektion WHV nachweisen mit einem starken Anstieg der Virämie in der 4. Woche. Wiederum gleichzeitig mit stärkstem Anstieg der Virämie wird der IFN-Peak in Woche 4 gemessen. Der höchste reziproke IFN-Titer beträgt 12 und liegt damit unterhalb der Werte der anderen Woodchucks. Es folgt ein Abfall der Virämie in der 7. Woche, 3 Wochen nach dem höchsten IFN-Wert. Ab der 9. Woche lässt sich mittels WHV-PCR keine virale DNA mehr nachweisen. Bei diesem Woodchuck fallen zwei SDH-Peaks auf. Der eine beträgt 481 U/L SDH in der 2. Woche und der andere beträgt an seinem maximalen Punkt 760 U/L SDH in der Woche 7, ca. 3 Wochen nach dem IFN-Peak und zeitgleich mit dem Abfall der WHV-DNA.

Der Verlauf der Infektion sowie die gemessenen Parameter des Woodchucks #14632 unterscheiden sich von den anderen, da zum einen die WHV-DNA mittels Spot-Blot-Hybridisierung nicht detektierbar ist. Des Weiteren ist der WHV-Level in der PCR schon ab Woche 6 gleichzeitig mit dem Abfall des IFN-Titers und vor dem SDH-Anstieg mit maximalen Werten in den Wochen 7 und 8 negativ. Und zum anderen ist der höchste IFN-Wert zu Beginn des Versuchs in Woche 0 mit einem reziproken Wert von 16 gemessen worden, welcher dann weiter absinkt. Die Untersuchungstiere sind Wildfänge, welche häufig Abszesse haben oder von Parasiten befallen sind. Auch diese Erkrankungen aktivieren das Immunsystem. Eine Beeinflussung des Verlaufs der WHV-Infektion durch eine bereits erhöhte, durch andere Ursachen stimulierte IFN-Produktion kann nicht ausgeschlossen werden.

Auch wenn diese Untersuchung der vier Woodchucks einige individuelle Unterschiede in den Verläufen zeigt, so kann bei fast allen Woodchucks ein Abfall der Virämie mittels Spot-Blot-Untersuchung und PCR wenige Wochen nach IFN-Peak gezeigt werden. Bei Woodchuck #14622 und #14624 ist parallel zum SDH-Peak als Zeichen der Leberschädigung ein deutlicher Abfall der Viruslast zu beobachten. Dies weist auf das Zusammenwirken nicht-zytopathischer Immunmechanismen über Zytokine und zytopathischer Immunmechanismen über zytotoxische T-Zellen hin.

## 4 Diskussion

Der Ablauf und die Immunpathogenese einer HBV-Infektion konnten bis heute zwar zum größten Teil, aber noch nicht in allen Einzelheiten geklärt werden. Da weltweit immer noch viele Menschen an den Folgen einer HBV-Infektion versterben, muss nach weiteren Therapiemöglichkeiten gesucht werden. Ansatzpunkte könnten in der Immunpathogenese vorhanden sein.

Die vorliegende Arbeit versucht diese Zusammenhänge in Hinblick auf die therapeutischen Möglichkeiten von IL-12 im Woodchuck-Modell näher zu untersuchen. Dieses Tiermodell des WHV-infizierten Woodchuck erweist sich aus verschiedenen Gründen als sehr geeignet zur Erforschung der HBV-Infektion. Aufgrund der großen Übereinstimmung bezüglich der Morphologie, des genomischen Aufbaus, der Genprodukte und der Replikationsmechanismen entspricht die Pathologie einer WHV-Infektion beim Woodchuck weitgehend der Pathologie einer HBV-Infektion im Menschen [Roggendorf, M. und Tolle, TK., 1995]. Durch die erstmalige Klonierung, Expression und Charakterisierung von Woodchuck Zytokinen wurden die Grundlagen geschaffen, um die immunologischen Vorgänge der Hepadnavirusinfektion in einem natürlichen Infektionsmodell genauer zu untersuchen [Lohrengel, B. et al., 1998]. Dadurch wurden weitere Untersuchungen an diesem Modell möglich, wie auch die Versuche dieser Arbeit. Es wurde zum einen die Auswirkung von humanem IL-12 auf die IFN-Produktion bei naiven und chronisch WHV-infizierten Woodchucks untersucht. Dabei stellte sich zu Beginn der Versuche die Frage, ob humanes IL-12 überhaupt die Produktion von Woodchuck-IFN steigern kann. In In-vitro-Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die peripheren Blutlymphozyten naiver Woodchucks nach Stimulation mit humanem IL-12 vermehrt IFN produzierten. In diesen Vorversuchen konnte sowohl gezeigt werden, dass mit humanem IL-12 vergleichbar gute Ergebnisse erzielt werden können wie mit murinem IL-12 und des Weiteren konnte eine optimale Dosis an IL-12 festgelegt werden, mit welcher die weiteren In-vitro-Versuche durchgeführt wurden.

In diesen weiteren Versuchen wurden die Überstände der peripheren Blutlymphozyten von naiven und chronisch WHV-infizierten Woodchucks nach ausschließlicher PHA- und zusätzlicher IL-12-Gabe mit dem EMCV-Bioassay auf den IFN-Gehalt getestet und verglichen. Diese Versuche wurden mit der Fragestellung durchgeführt, wie sich die IL-12-Stimulation im Vergleich zu ausschließlicher PHA-Stimulation auf die peripheren Blutlymphozyten auswirkt und ob Unterschiede in der IFN-Produktion der peripheren Blutlymphozyten naiver und chronisch WHV-infizierter Woodchucks bestehen.

Nach IL-12- oder ausschließlicher PHA-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten WHV-negativer Woodchucks konnte ein deutlicher Unterschied der IFN-Produktion gesehen werden. Die zusätzliche IL-12-Stimulation führte bei den peripheren Blutlymphozyten der naiven Tiere zu einer gesteigerten IFN-Produktion, welche 2 bis 7 Titerstufen über alleiniger PHA-Stimulation lag. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Daten anderer Arbeitsgruppen, die gezeigt haben, dass die IFN-Produktion in Mäusen durch IL-12 gesteigert werden konnte [Cavanaugh, VJ. et al., 1997], [Trinchieri, G. et al., 1994].

Bei gleichem Versuchsaufbau induzierte die IL-12-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten der chronisch WHV-infizierten Woodchucks keine messbare IFN-Produktion. Nach alleiniger PHA-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten chronisch WHV-infizierter Woodchucks wurden bereits höhere IFN-Titer induziert im Vergleich zum Versuch mit PHA-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten naiver Tiere. Die zusätzliche IL-12-Stimulation war bei den peripheren Blutlymphozyten der chronisch WHV-infizierten Tiere nicht in der Lage eine noch höhere IFN-Produktion zu induzieren.

Diese Daten, die in In-vitro-Versuchen mit peripheren Blutlymphozyten erhoben wurden, geben einen ersten Hinweis auf eine unterschiedliche Reagibilität von peripheren Blutlymphozyten naiver und chronisch WHV-infizierter Woodchucks auf Immunstimulation mit IL-12.

Die IL-12-Therapie kann neben den peripheren Blutlymphozyten weitere Immunzellen, wie z.B. NK- und CD8+-Zellen, sowie die Ausschüttung weiterer Zytokine, z.B. von IL-2 aktivieren. Dadurch sind bei einer In-vivo-Therapie trotz unserer In-vitro-Daten



therapeutische Effekte auf die Virämie denkbar. Chronisch WHV-infizierte Woodchucks wurden mit unterschiedlichen Dosierungen rhIL-12 behandelt und deren Seren danach im Bioassay auf den IFN-Gehalt getestet. Im Bioassay konnte kein IFN nachgewiesen und mittels Spot-Blot-Hybridisierung kein signifikanter Effekt auf die Virämie festgestellt werden. Ein toxischer Effekt anderer im Serum vorhandener Substanzen, die im Bioassay gestört haben könnten, wurde durch die Testung eines Woodchuck-Serums, dem wIFN- $\gamma$  zugefügt worden war, ausgeschlossen. Eine unter, aber vor und nach der Therapie mit den hohen IL-12-Dosen nicht beobachtete Fluktuation der Viruslast innerhalb einer  $\frac{1}{2}$  log-Stufe stellt allerdings einen Hinweis auf die biologische Wirksamkeit des humanen IL-12 dar.

Die Ergebnisse der In-vitro- und In-vivo-Versuche lassen insgesamt vermuten, dass die Ursache für die unterschiedliche IFN-Induktion nach Stimulation der peripheren Blutlymphozyten naiver oder chronisch WHV-infizierter Woodchucks mit IL-12 in einer Adaptation an die chronische WHV-Infektion zu liegen scheint.

Dieser Aspekt wurde in einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe weiter untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass wIFN- $\gamma$  die WHV-Replikation in primären Hepatozytenkulturen chronisch WHV-infizierter Woodchucks nicht reduzieren kann [Lu, M. et al., 2002]. Auf der anderen Seite konnte die WHV-Replikation in Hepatozyten naiver Tiere, die in vitro infiziert worden waren, unterdrückt werden. Als Folge der chronischen WHV-Infektion der Hepatozyten scheint die Reagibilität der Immunzellen auf IFN- $\gamma$  alteriert zu sein.

In In-vivo-Versuchen, in denen die lokale Expression von wIFN- $\gamma$  in der Leber nach Transduktion mit einem adenoviralen Vektor, der wIFN- $\gamma$  exprimierte, keine Reduktion der Virämie induzierte, wurden diese Daten weiter untermauert. Die IFN- $\gamma$ -Expression in der Leber konnte über Induktion von Interferon-induzierbarem Protein (IP-10) nachgewiesen werden. In parallel durchgeführten Versuchen mit einem adenoviralen Vektor, der wIFN- $\alpha$  exprimierte, konnte eine Reduktion der Virämie gezeigt werden [Fiedler, M. et al., 2004].

Im Unterschied zu diesen Daten im Woodchuck-Modell wurde im HBV-transgenen Mausmodell eine Reduktion der hepadnaviralen Replikation durch IFN- $\gamma$ -Induktion nach IL-12-Stimulation beobachtet [Guidotti, LG. et al., 1999]. Im HBV-transgenen Mausmodell wurde durch den Transfer HBV-spezifischer CTLs die Bedeutung von IFN- $\gamma$  für die Reduktion der Virämie belegt.

Cavanaugh et al. zeigten speziell die Bedeutung von IFN- $\gamma$  bei der antiviralen Wirkung von IL-12, indem in einem Versuch mit transgenen Mäusen nach IL-12-Stimulation IFN- $\gamma$  mit Antikörpern geblockt wurde und der HBV-DNA-Level in diesen Versuchen wesentlich höher lag als in den Tieren, bei denen IFN- $\gamma$  nicht geblockt wurde [Cavanaugh, VJ. et al., 1997]. HBV-transgene Mäuse zeigen auf der einen Seite eine leberspezifische HBV-Genexpression und –Replikation, allerdings liegt eine immunologische Toleranz gegen HBV vor. Somit sind die Leberzellen im Unterschied zur chronischen Infektion im Woodchuck nicht dauerhaft entzündlichen Zytokinen ausgesetzt. Die Hepatozyten HBV-transgener Mäuse sind also naiv bezogen auf die IFN- $\gamma$ -Wirkung und nicht an eine langanhaltende Erhöhung von IFN- $\gamma$  adaptiert.

In einer klinischen Phase I/II-Studie wurde IL-12 kurzzeitig an Patienten getestet als eine Therapieform der chronischen HBV-Infektion. Diese Patienten zeigten nach 12 Wochen deutlich niedrigere HBV-DNA-Level, allerdings hatten sie auch gravierende Nebenwirkungen wie erhöhte Lebertransaminasen bis hin zum fulminantem Leberversagen [Carreño, V. et al., 2000]. Die Therapie mit hohen IL-12-Dosen im Woodchuck-Modell induzierte dagegen keine Reduktion der WHV-Replikation, allerdings konnten wir unter Therapie eine Fluktuation der WHV-DNA-Level beobachten. Die ausgeprägten Nebenwirkungen der IL-12-Therapie beim Menschen waren in den In-vivo-Versuchen dieser Arbeit bei den Woodchucks nicht zu beobachten. Die geringere Wirksamkeit und Nebenwirkungsrate der IL-12-Therapie könnte auf die Verwendung von humanem IL-12 im Woodchuck-Modell, also nicht woodchuck-spezifischem IL-12, zurückzuführen sein.

Zum besseren Verständnis der Rolle von IFN und des Ablaufs der Immunpathogenese bei WHV-Infektion wurde zusätzlich ein Versuch der akuten WHV-Infektion im Woodchuck-Modell durchgeführt. Zum einen sollte dabei die IFN-Produktion im Verlauf einer akuten Infektion dargestellt werden und ebenso der Zusammenhang des IFN-Titers zur Virämie mittels Messung der WHV-DNA mit PCR und Spot-Blot-Hybridisierung und zur Leberschädigung über Darstellung des SDH-Verlaufs. Die Seren wurden direkt nach Entnahme im Bioassay getestet.

Bei allen getesteten Woodchucks konnte in Woche 4 oder 5 nach Infektion ein IFN-Peak gemessen werden, der zeitgleich mit den höchsten WHV-DNA-Werten auftrat. Nach zeitlichem Abstand von ca. 2 – 3 Wochen nach dem IFN-Peak war ein SDH-Peak zu beobachten, der mit einem deutlichen Abfall der Viruslast einherging. IFN scheint eine Immunkaskade in Gang gesetzt zu haben, welche im Rahmen der Viruselimination auch zur Zerstörung von Hepatozyten führt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stimmen z.T. mit den schon vorher erwähnten Ergebnissen im transgenen Mausmodell überein. In diesem Modell wurde die Bedeutung der Zytokinproduktion, insbesondere der IFN- $\gamma$ -Produktion durch CTLs auf die nicht-zytopathische HBV-Elimination gezeigt [Guidotti, LG. und Chisari, FV., 2001].

Auch im Schimpansenmodell konnte die Bedeutung von IFN- $\gamma$  in der akuten hepadnaviralen Infektion belegt werden [Thimme, R. et al., 2003]. Der Ablauf der Immunantwort bei HBV-infizierten Schimpansen zeigte, dass die CD4+-Zellen eine große Bedeutung in den ersten sechs Wochen nach Infektion spielen. Zur weiteren Kontrolle der Infektion werden dann die CD8+-Zellen zunehmend wichtiger. In den Versuchen zeigte sich außerdem, dass die virale DNA zeitgleich mit der IFN- $\gamma$ -Induktion um über 90% absank. Erst im Anschluss an diesen nicht-zytopathischen Weg der Viruselimination vermutet man direkte zytolytische Mechanismen durch CTL, welche die übrig gebliebenen infizierten Zellen beseitigen.

Auch bei akut selbst-limitierender HBV-Infektion im Menschen findet bereits in der Inkubationsphase eine maximale Reduktion der HBV-DNA-Konzentration statt, die mit

dem Nachweis von virus-spezifischen CD8+ und CD4+-Zellen auftritt. In dieser Phase ist noch keine Leberzellschädigung über einen Anstieg der Transaminasen messbar. Wie bereits im Schimpansen-Modell gezeigt, scheint auch beim Menschen die nicht-zytopathische Elimination von HBV eine entscheidende Rolle zu spielen. Ein Patient, bei dem keine virus-spezifischen CD8+ und CD4+-Zellen im Frühstadium der Infektion nachweisbar waren, entwickelte eine chronische Infektion [Webster, G.J. et al., 2000].

Zum Zeitpunkt, als die Untersuchungen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden, konnten im Woodchuck-Modell noch keine CD8+-Zellen gemessen werden. Kürzlich gelang unserer Arbeitsgruppe zum Nachweis der CTL-Antwort im Woodchuck die Etablierung eines CD107a Degranulationsassays. Ab Woche 5 nach akuter WHV-Infektion wurde eine ausgeprägte T-Zellantwort gemessen, die in chronisch WHV-infizierten Tieren nicht nachweisbar war [Frank, I. et al, 2007].

Zusammenfassend scheint die Bedeutung von IFN- $\gamma$  bei der Reduktion der hepadnaviralen DNA bei der akuten und der chronischen Infektion unterschiedlich bewertet werden zu müssen. Bei der akuten Infektion kennzeichnet die Induktion von IFN- $\gamma$  den Beginn einer Immunreaktion, die in der Überwindung der Infektion resultieren kann. Bei der chronischen hepadnaviralen Infektion am Beispiel des Woodchuck dagegen scheint eine zusätzliche IFN- $\gamma$ -Stimulation die Viruslast nicht reduzieren zu können. Die Zukunft wird zeigen, ob eine immunmodulatorische Therapie der chronischen hepadnaviralen Infektion, z.B. mit Zytokinen oder Vakzination in Kombination mit einer antiviralen Therapie zu einer endgültigen Elimination von HBV führen kann.

## **5 Zusammenfassung**

An den Folgen der Hepatitis-B-Virus (HBV)-Infektion versterben jährlich ca. 1-2 Millionen Menschen weltweit. Die bisher angewendeten Therapien sind nicht ausreichend effektiv. Neue Ansätze könnten in der Immunpathogenese der Erkrankung zu finden sein. In dieser Arbeit wurden in In-vitro- und In-vivo-Versuchen an naiven und chronisch Woodchuck-Hepatitis-Virus (WHV)-infizierten Woodchucks die Auswirkungen von Interleukin (IL)-12 auf die Interferon (IFN)- $\gamma$ -Produktion und auf die Virämie getestet. Außerdem wurde der Verlauf der IFN-Konzentration während einer akuten Infektion charakterisiert.

Die In-vitro-Versuche zeigten, dass durch die Gabe von IL-12 die IFN- $\gamma$ -Produktion in peripheren Blutlymphozyten naiver Woodchucks induziert wird. Bei den peripheren Blutlymphozyten der chronisch WHV-infizierten Tiere ist dies nicht der Fall. Die Lymphozyten dieser Tiere zeigten bereits nach Stimulation mit Phythämagglutinin (PHA) als Grundstimulus eine starke IFN-Produktion, die bei den Lymphozyten der naiven Tiere fehlte. Die Gabe von IL-12 führte zu keiner weiteren Steigerung der IFN-Produktion der Lymphozyten der chronisch WHV-infizierten Woodchucks. Eine IL-12-Therapie chronisch WHV-infizierter Woodchucks in vivo zeigte keine signifikante Reduktion der Viruslast. Als Folge der chronischen WHV-Infektion scheint die Reagibilität der Immunzellen auf IFN- $\gamma$  alteriert zu sein.

In dem Versuch der akuten WHV-Infektion wurde ein Abfall der Virämie nach IFN-Peak und zum Teil parallel zum Sorbitoldehydrogenase-Peak als Zeichen der Leberschädigung gesehen. Im Zusammenhang mit neueren Ergebnissen unserer und anderer Arbeitsgruppen wird deutlich, dass neben dem zytopathischen Weg der Viruselimination auch dem nicht-zytopathischen Weg eine wichtige Bedeutung zukommt.

Diese Erkenntnisse zur Immunpathogenese können eventuell in Zukunft zur Entwicklung effektiverer Behandlungsstrategien in der Bekämpfung der HBV-Infektion beitragen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Bertoletti, A., Ferrari, C., Fiaccadori, F., Penna, A., Margolskee, R., Schlicht, HJ., Fowler, P., Guilhot, S., Chisari, FV. (1991): HLA-class-I-restricted human cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 10445-10449
2. Blaine Hollinger, F., Jake, Liang, T. (2001): Hepatitis B virus. In Knipe, DM., Howley, PM., Griffin, DE. (Hrsg.): *Fields Virology*. 4. Auflage. CD-ROM-Version, Philadelphia, New York: Lippincott Williams & Wilkins
3. Bliss, J., Van Cleave, V., Murray, K., Wiencis, A., Ketchum, M., Maylor, R., Haire, T., Resmini, C., Abbas, AK., Wolf, SF. (1996): IL-12, as an adjuvant, promotes a T helper 1 cell, but does not suppress a helper 2 cell recall response. *J. Immunol.* 156(3), 887-894
4. Carreño, V., Zeuzem, S., Hopf, U., Marcellin, P., Cooksley, WG., Fevery, J., Diago, M., Reddy, R., Peters, M., Rittweger, K., Rakhit, A., Pardo, M. (2000): A phase I/II study of recombinant human interleukin-12 in patients with chronic hepatitis B. *J. Hepat.* 32, 317-324
5. Cavanaugh, VJ., Guidotti, LG., Chisari, FV. (1997): Interleukin-12 inhibits hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* 71(4), 3236-3243
6. Colonno, RJ., Rose, RE., Levine, SM., Pokornowski, K.; Plym, M., Yu, LF., Baldick, CJ., Zhang, S., Walsh, AW., Discotto, L., Fang, J., Tenney, DJ. (2004): Emergence of entecavir resistant hepatitis B virus after one year of therapy in phase II & III studies is only observed in lamivudine refractory patients. *Hepatology* 40(4), 1140A

7. Cornberg, M., Protzer, U., Dollinger, MM., Petersen, J., Wedemeyer, H., Berg, T., Jilg, W., Erhardt, A., Wirth, S., Schirmacher, P., Fleig, WE., Manns, MP. (2007): Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis- B- virus-(HBV-)infection: upgrade of the guideline, AWMF-Register 021/011. Z Gastroenterol. 45(6), 525-74. Epub
8. Dienstag, JL., Perrillo, RP., Schiff, ER., Bartholomew, M., Vicary, C., Rubin, M. (1995): A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B infection. N. Engl. J. Med. 333, 1657-1661
9. Dienstag, JL., Schiff, ER., Wright, TL., Perrillo, RP., Hann, HW., Goodman, Z., Crowther, L., Condeay, LD., Woessner, M., Rubin, M., Brown, NA. (1999): Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. N. Engl. J. Med. 341, 1256-1263
10. Fiedler, M., Röddicker, F., Salucci, V., Lu, M., Aurisicchio, L., Dahmen, U., Jun, L., Dirsch, O., Pützer, BM., Palombo, F., Roggendorf, M. (2004): Helper-dependent adenoviral vector-mediated delivery of woodchuck-specific genes for alpha interferon (IFN- $\alpha$ ) and IFN- $\gamma$ : IFN- $\alpha$  but not IFN- $\gamma$  reduces woodchuck hepatitis replication in chronic infection in vivo. J. Virol. 78, 10111-10121
11. Frank, I., Budde, C., Fiedler, M., Dahmen, U., Viazov, S., Lu, M., Dittmer, U., Roggendorf, M. (2007): Acute resolving woodchuck hepatitis virus (WHV) infection is associated with a strong cytotoxic T-lymphocyte response to a single WHV core peptide. J. Virol. 81, 7156-7163
12. Fujiwara, H., Zou, JP., Herrmann, S., Hamaoka, T. (1995): A sequence of cellular and molecular events involved in IL12-induced tumour regression. Immunology 638-644
13. Gately, MK. (1997): Interleukin-12: potential clinical applications in the treatment of chronic viral hepatitis. J. Viral. Hepat. 4 Suppl 1, 33-39
14. Gerlich, WH., Schaefer, S. (2002) : Hepadnaviren: Hepatitis-B-Virus. In: Doerr, HW., Gerlich, WH. (Hrsg.): Klinische Virologie. 1. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag

15. Guidotti, LG., Chisari, FV. (2001): Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 65-91
16. Guidotti, LG., Ishikawa, T., Hobbs, MV., Matzke, B., Schreiber, R., Chisari, FV. (1999): Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 4(1), 25-36
17. Kakumu, S., Ishikawa, T., Wakita, T., Yoshioka, K., Takayanagi, M., Tahara, H., Kusakabe, A. (1994): Interferon-gamma production specific for hepatitis B virus antigen by intrahepatic T-lymphocytes in patients with acute and chronic hepatitis B. *Ann. J. Gastro.* 89, 92-96
18. Kodama, K., Ogasawara, N., Yoshikawa, H., Murakami, S. (1985): Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome – Evolutional relationship between hepadnaviruses. *J. Virol.* 56, 978-986
19. Korba, BE., Cote, PJ., Wells, FV., Baldwin, B., Popper, H., Purcell, RH., Tennant, BC., Gerin, JL. (1989): Natural history of woodchuck hepatitis virus infection during the course of experimental viral infection: Molecular virologic features of the liver and lymphoid tissue. *J. Virol.* 63, 1360-1370
20. Lai, CL., Chien, RN., Leung, NW., Chang, TT., Guan, R., Tai, DI., Ng, KY., Wu, PC., Dent, JC., Barber, J., Stephenson, SL., Gray, DF. (1998): A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *N. Engl. J. Med.* 229, 61-68
21. Lamant, AG., Adorini, L. (1996): IL-12: a key cytokine in immune regulation. *Immunol. today* 17(5), 214-217
22. Lau, GK., Piratvisuth, T., Luo, KX., Merrellin, P., Thongsawat, S., Cooksley, G., Gane, E., Fried, MW., Chow, WC., Paik, SW., Chang, WY., Berg, T., Flisiak, R., McCloud, P., Pluck, N. (2005): Peginterferonalfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* 352, 2682-95



23. Lee, WM. (1997): Hepatitis B virus infection. *N. Engl. J. Med.* 337, 1733-1745
24. Leung, N. (2000): Management of chronic hepatitis B: Nucleosid analogues in the treatment of chronic hepatitis B. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, E53-E60
25. Locksley, RM. (1993): Interleukin 12 in host defense against microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 5879-5880
26. Lohrengel, B., Lu, M., Roggendorf, M. (1998): Molecular cloning of the woodchuck cytokines: TNF-alpha, INF-gamma, and IL-6. *Immunogenetics* 47, 332-335
27. Lok, A., Heathcote, E., Hoofnagle, JH. (2001): Management of hepatitis B: summary of a workshop. *Gastroenterology* 39(Suppl. 1), 1828-1853
28. Lu, M., Lohrengel, B., Hilken, G., Kemper, T., Roggendorf, M. (2002): Woodchuck gamma interferon upregulates major histocompatibility complex class I transcription but is unable to deplete woodchuck hepatitis virus replication intermediates and RNAs in persistently infected woodchuck primary hepatocytes. *J. Virol.* 67(1), 58-67
29. Malik, AH., Lee, WM. (2000): Chronic hepatitis B virus infection: treatment strategies for the next millenium. *Ann. Intern. Med.* 132(9), 723-731
30. Marcellin, P., Asselah, T., Boyer, N. (2005): Treatment of chronic hepatitis B. *J. Viral. Hepatitis* 12, 333-345
31. Marcellin, P., Lau, GK., Bonino, F., Farci, P., Hadzlyannis, S., Jin, R., Lu, ZM., Piratvisuth, T., Germanidis, G., Yurdaydin, C., Diago, M., Gurel, S., Lai, MY., Button, P., Pluck, N. (2004): Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* 351, 1206-17
32. Mehrota, PT., Wu, D., Crim, JA., Mostowski, HS., Siegel, JP. (1993): Effects of IL-12 on the generation of cytotoxic activity in human CD8+T lymphocytes. *J. Immunol.* 151, 2444-2452

33. Menne, S., Cote, JP. (2007): The woodchuck as an animal model for pathogenesis and therapy of chronic hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol.* 13(1), 104-124
34. Niederau, C., Heintges, T., Lange, S., Goldmann, G., Niederau, CM., Mohr, L., Haussinger, D. (1996): Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alpha for chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* 334, 1422-1427
35. Osborn, M., Lok, A. (2006): Antiviral options for the treatment of chronic hepatitis B. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 1030-1034
36. Ozmen, L., Aguet, M., Trinchieri, G., Garotta, G. (1995): The in vivo antiviral activity of interleukin-12 is mediated by gamma interferon. *J. Virol.* 69(12), 8147-8150
37. Ponzetto ,A., Cote, PJ., Ford, EC., Purcell, R., Gerin, JL. (1984): Core antigen and antibody in woodchucks after infection with woodchuck hepatitis. *J. Virol.* 52, 70-76
38. Robert Koch Institut (2006): Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2005. S. 89-94
39. Robinson, WS. (1995): Hepadnaviridae: Hepatitis B virus and hepatitis D virus. In: Mandell, GL., Bennett, JE., Dolin, R. (Hrsg.): *Principles and practice of infectious diseases*. 4<sup>th</sup> edition. New York usw. S. 1406-1439
40. Roggendorf, M., Tolle, TK. (1995): The woodchuck: an animal model for hepatitis B virus infection in man. *Intervirology* 38, 100-112
41. Rossol, S., Marinos, G., Carucci, P., Singer, M., Williams, R., Naoumov, NV. (1997): Interleukin-12 induction of Th1 cytokines is important for viral clearance in Chronic hepatitis B. *J. Clin. Invest.* 99, 3025-3033
42. Rote Liste 2005: Arzneimittelverzeichnis für Deutschland. Aulendorf: Editio Cantor Verlag
43. Schmid, M.(1986): Klinik der Virushepatitiden. In: Gsell, O., Krech, U., Mohr, W.: *Klinische Virologie*, München: Urban und Fischer Verlag, S. 185-198

44. Scott, P. (1993): IL-12: Initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science* 260, 496-497
45. Seder, RA., Kelsall, BL., Jankovic, D. (1996): Differential roles for IL-12 in the maintenance of immune responses in infectious versus autoimmune disease. *J. Immunol.* 157, 2745-2748
46. Stern, AS., Podlaski, FJ., Hulmes, JD., Pan, YC., Quinn, PM., Wolitzky, AG., Familetti, PC., Stremlo, DL., Truitt, T., Chizzonite, R., Gately, MK. (1990): Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 6808-6812
47. Stites DP., Terr AI., Parslow TG. (1997): *Medical Immunology* 9<sup>th</sup> edition, Stamford, CT., USA: Appleton & Lange Verlag
48. Suarez, Y., Franca, AC., Llovet, M., Fuster, J., Bruix, J. (2000): The current status of liver transplantation for primary hepatic malignancy. *Clin. Liver Dis.* 4, 591-605
49. Summers, J., Smolec, JM., Snyder, R. (1978): A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc. Acad. Sci.* 75, 4533-4537
50. Thimme, R., Wieland, S., Steiger, C., Ghayeb, J., Reimann, KA., Purcell, RH., Chisari, FV. (2003): CD8+T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J. Virol.* 77, 68-76
51. Trinchieri, G. (1994): Interleukin 12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 84, 4008-4027
52. Webster, GJM., Reignat, S., Maini, MK., Whalley, SA., Ogg, GS., King, A., Brown, D., Amlot, PL., Williams, R., Vergani, D., Dusheiko, GM, Bertoletti, A. (2000): Incubation phase of acute hepatitis B in man: Dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology*; 32, 1117-1124
53. Wedemeyer, H.H., Manns, M.P. (1998): *Innere Medizin*. 4. Aufl. München usw.: Urban und Schwarzenberg; S. 663-675

54. Yim, HJ., Lok, AS. (2006): Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology* 43(2 Suppl1), S173-81

## **7 Abkürzungsverzeichnis**

cccDNA	Covalently closed circular DNA
CD	Cluster of differentiation
CMLF	Cytotoxic lymphocyte maturation factor
CTL	Cytotoxic lymphocytes
DHBV	Duck hepatitis B virus
DNA	Desoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMCV	Encephalo-myocarditis-virus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fötales Kälberserum
GSHV	Ground squirrel hepatitis virus
HBcAg	Hepatitis-B-core-Antigen
HBeAg	Hepatitis-B-e-Antigen
HBsAg	Hepatitis-B-surface-Antigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HIV	Human immunodeficiency virus
IgM	Immunglobuline der Klasse M (M für Makroglobuline)
IgG	Immunglobuline der Klasse G (G für Gammaglobuline)
IL	Interleukin
IFN	Interferon
kD	Kilodalton
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger RNA
MTA	Medizinisch-technische Assistentin
MTP	Mikrotiterplatte
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)

NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form)
NK-Zellen	Natural killer Zellen
PBS	Phosphat-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PHA	Phythämagglutinin
rh	recombinant human
RNA	ribonucleic acid
rw	recombinant woodchuck
SDH	Sorbitoldehydrogenase
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
WHV	Woodchuck-Hepatitis-Virus

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verläufe verschiedener HBV-Infektionsformen [Gerlich, WH. und Schaefer, S., 2002].....	10
Abbildung 2: Versuchsaufbau der In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchucks.....	26
Abbildung 3: Ablauf der WHV-PCR.....	30
Abbildung 4: Ergebnisse von Woodchuck #880 nach Stimulation der peripheren Blutlymphozyten mit rekombinantem humanem IL-12.....	36
Abbildung 5: Ergebnisse von Woodchuck #880 nach Stimulation der peripheren Blutlymphozyten mit rekombinantem murinem IL-12.....	36
Abbildung 6: Ergebnisse von Woodchuck #881 nach Stimulation der peripheren Blutlymphozyten mit rekombinantem humanem IL-12.....	37
Abbildung 7: Ergebnisse von Woodchuck #881 nach Stimulation der peripheren Blutlymphozyten mit rekombinantem murinem IL-12.....	37
Abbildung 8: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #13198.....	40
Abbildung 9: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #13199.....	40
Abbildung 10: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #13200.....	41
Abbildung 11: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #13204.....	41
Abbildung 12: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #13207.....	42
Abbildung 13: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #13208.....	42
Abbildung 14: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #11562.....	44

Abbildung 15: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #11563.....	45
Abbildung 16: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #11564.....	45
Abbildung 17: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #11566.....	46
Abbildung 18: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #11569.....	46
Abbildung 19: IFN-Produktion nach In-vitro-Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von Woodchuck #11573.....	47
Abbildung 20: WHV-DNA-Level während/nach IL-12-Therapie.....	49
Abbildung 21: WHV-Infektionsverlauf bei Woodchuck #14622.....	51
Abbildung 22: WHV-Infektionsverlauf bei Woodchuck #14623.....	51
Abbildung 23: WHV-Infektionsverlauf bei Woodchuck #14624.....	52
Abbildung 24: WHV-Infektionsverlauf bei Woodchuck #14632.....	52



## **9 Danksagung**

Herrn Professor Dr. med. M. Roggendorf danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für Virologie zu erstellen sowie für die Überlassung des Themas.

Frau Dr. med. Melanie Fiedler möchte ich ganz herzlich für die wissenschaftliche Führung, die Geduld und Motivation sowie für die verlässliche Unterstützung, die zahlreichen Anregungen und Bewertung der vorgelegten Arbeit danken.

Besonders zu erwähnen ist auch die tatkräftige Hilfe von Frau Anja Mayer und Frau Thekla Kemper, welche durch ihre Hilfsbereitschaft und viele praktische Ratschläge zum Gelingen der Versuche beigetragen haben.

Das Projekt wurde gefördert durch das IFORES-Programm. Auch für diese finanzielle Hilfe möchte ich an dieser Stelle Dank sagen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und Arco für deren Geduld, Zuversicht und positive Motivation. Sie haben mich mit tatkräftiger Hilfe unterstützt und ihnen widme ich deshalb diese Arbeit.

## **10 Lebenslauf**

### **Persönliche Angaben:**

Name	Christine Stolk, geb. Pohl, wohnhaft in Soest
Geburtstag	18.04.1977
Geburtsort	Haselünne
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Maria Pohl, geb. Heller, MTA Reinhard Pohl, Technischer Angestellter

### **Schulausbildung:**

1983 -1987	Grundschule in Baccum
1987 – 1996	Gymnasium Leoninum in Handrup
1996	Abitur
1996 – 1997	Broward Community College, Ft. Lauderdale, USA Tennisstipendium

### **Hochschulausbildung:**

1997 – 1999	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle/Saale
Herbst 1999	Ärztliche Vorprüfung
1999 – 2004	Fortführung des Studiums der Humanmedizin an der Universität Duisburg-Essen
Herbst 2000	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Frühjahr 2003	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Frühjahr 2004	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **Famulaturen:**

Febr.-März 2000	Famulatur Innere Medizin am Elisabeth-Krankenhaus in Thuine
September 2000	Famulatur am Institut für Virologie, Universitätsklinikum Essen
Febr.-März 2001	Famulatur Chirurgie am Elisabeth-Krankenhaus in Thuine
Juli-Sept. 2001	Famulatur Chirurgie am Oakville Trafalgar Memorial Hospital, Kanada
Sept.-Okt. 2002	Famulatur Allgemeinmedizin in der Praxis von Herrn Hater, Lingen

**Praktisches Jahr:**

April 2003 - Juli 2003	1.Tertial: Chirurgie am Kantonsspital Winterthur, Schweiz
Aug. 2003 - Nov. 2003	2.Tertial: Innere Medizin an den Wedau-Kliniken Duisburg, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Duisburg-Essen
Dez. 2003 - März 2004	3.Tertial: Pädiatrie an den Wedau-Kliniken Duisburg, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Duisburg-Essen

**Berufserfahrung:**

Juli 2004 – Dez. 2007	Assistenzärztin in der Kinderklinik der Wedau-Kliniken Duisburg
Jan. 2008 – Aug. 2008	Assistenzärztin in der Pädiatrischen Abteillung im Karolinen-Hospital, Hünen
Sep. 2008 – heute	Assistenzärztin in der Kinderarztpraxis von Herrn Haarmann-Thiemann, Sundern